

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

**INVESTIGAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO QUIMIOPROTETOR DO
ZINCO NA CARCINOGENÊSE DO CÓLON INDUZIDA PELA 1,2-
DIMETILHIDRAZINA EM RATOS WISTAR MACHOS.**

FLÁVIA REGINA MORAES DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU - SP

2011

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

**INVESTIGAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO QUIMIOPROTETOR DO
ZINCO NA CARCINOGENÊSE DO CÓLON INDUZIDA PELA 1,2-
DIMETILHIDRAZINA EM RATOS WISTAR MACHOS.**

MESTRANDA: FLÁVIA REGINA MORAES DA SILVA

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARCHESAN RODRIGUES

CO-ORIENTADOR: LUÍS FERNANDO BARBISAN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU - SP

2011

Ficha catalográfica

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Divisão de Biblioteca e Documentação - Campus de Botucatu - Unesp

Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Silva, Flávia Regina Moraes da.

Influência do zinco na carcinogênese do cólon induzida pela 1,2-Dimetilhidrazina, em ratos Wistar machos / Flávia Regina Moraes da Silva. - Botucatu, 2011.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Co-orientador: Luis Fernando Barbisan

Capes: 20804008

1. Cólon - Câncer - Estudos experimentais 2. Zinco

Palavras-chave: Carcinogênese do cólon; Foco da cripta aberrante; Quimioprevenção; Zinco

Dedicatória

Ao meu grande Deus:

Por ter guiado meus passos até aqui, pela proteção e direção diante de tantos desafios. Graças dou ao meu Deus, por ser meu fiel ajudador, pela força adquirida de suas mãos nos momentos difíceis e por ter colocado as pessoas certas no meu caminho, que de uma forma ou de outra, tem contribuído para a concretização de um grande sonho. Agradeço a ti senhor por sua infinita bondade.

Aos meus pais:

José Carlos da Silva e Lurdes Aparecida Moraes da Silva, pelo exemplo de caráter, dignidade e bondade. Por todo carinho e apoio, sempre acreditando nesta conquista. Obrigada pela compreensão e por terem aceito a minha ausência para que pudesse realizar este trabalho.

Agradecimento Especial

À profa. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

(Tuca):

Uma excelente profissional, com carinho, aceitou a tarefa de me orientar. Sou imensamente grata pelo incentivo e o fortalecimento através da leitura atenta deste trabalho. Não apenas valorizo os comentários e observações críticas a respeito do texto, mas também sua amizade.

A ela meu sincero reconhecimento, agradecimento e meu muito obrigada!

Ao professor. Dr. Luís Fernando Barbisan:

*Pela concessão de uso da infra-estrutura do **Laboratório de Carcinogênese Química Experimental (LCQE)**. Pela inestimável ajuda, prontidão e importantes sugestões que contribuíram para realização do trabalho. Muito obrigada!*

Ao Marcos Correa Dias (Spke):

Amigo de todas as horas, pelos esclarecimentos no decorrer deste trabalho, pela dedicação, incentivo e amizade, e é claro pelos momentos de descontração e muitas risadas.

À Gisele Aparecida Dionízio Lopes:

Minha eterna gradidão a essa grande amiga, pelo incentivo ao ingresso neste programa, por não ter medido esforços para me ajudar, pela sua sincera amizade e exemplo de rigor e seriedade profissional que tem me encorajado a persistir na vida acadêmica, especialmente em momentos decisivos.

Agradecimentos

De modo geral, quero agradecer todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte da minha vida e foram importantes neste período, em especial:

Aos meus irmãos Victor Paulo e Carlos Alexandre pelo incentivo, carinho e amizade.

À Nelci, pela amizade, companheirismo e convivência que renderam momentos muito divertidos.

A minha amiga irmã Valéria pelo apoio, força incentivo, amizade e pelos momentos de felicidades e tristezas compartilhados. Gostaria de registrar que é sempre muito acalentador saber poder contar com um ombro amigo.

Aos meus irmãos na fé que compartilharam muitos momentos durante esta jornada, me ajudando e fortalecendo com suas orações e ricas amizades, e torcendo pelo desenvolvimento do trabalho: Sara, Silvana, Cláudia, Keila, Selma, Marcelo, Rodrigo, Cida, Maria Helena, Alzira, Bete e Jefte.

Ao Técnico de biotério Paulo Cesar Georgete (PC), pelo auxílio nas atividades do biotério, tratamentos, sacrifícios e necropsias dos animais.

Ao Alaor, pela simplicidade e atenção com que me recebia em sua sala, e competência na realização das dosagens de zinco.

*Aos funcionários do **Departamento de Morfologia e de Patologia**, e aos funcionários da Pós-Graduação, pelo auxílio e competência.*

Emfim, a todos que me sustentaram no ombro para que eu pudesse ir mais adiante!

Este estudo recebeu o apoio financeiro das seguintes instituições:

*Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Cnpq
(130359/2010-6).*

*Curso de Pós-Graduação em Patologia – Faculdade de Medicina de
Botucatu UNESP - SP.*

*Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina de Botucatu -
UNESP - SP.*

*Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências de Botucatu -
UNESP - SP.*

Sumário

I. Revisão de literatura	01
I.1 Câncer do cólon	02
I.2 Carcinogênese experimental	04
I.3 Potencial quimioprotetor do zinco	06
I.4 Modelo experimental da carcinogênese do cólon	15
I.5 Focos de criptas aberrantes (FCA)	17
II. Referências bibliográficas	20
III. Objetivos gerais	34
IV. Artigo 1	36
V. Artigo 2	37
VI. Conclusões gerais	38
VII. Anexos	40

Lista de Figuras

I. Revisão de literatura	01
Figura 1. Tipos de câncer com maior incidência na população brasileira feminina e masculina para o ano de 2010	03
Figura 2. Mecanismo de absorção do zinco	10
Figura 3. Biotransformação da 1,2-dimetilhidrazina	16

Lista de Tabelas

I. Revisão de literatura	01
Tabela 1. Estimativas do número de novos casos por tipo de câncer no ano de 2010, em homens e mulheres	03
Tabela 2. Alimentos que contém zinco	07
Tabela 3. Compostos de zinco usados para suplementação	09

Lista de Figuras

IV. Artigo 1	36
Figura 1. Protocolo experimental quelato de zinco (ZnGly)	24
Figura 2. Focos de criptas aberrantes (FCA) identificados pela coloração de azul de metileno	25
Figura 3. Cortes histológicos de criptas intestinais de animal não iniciado e Iniciado pela DMH	25
Figura 4. Corte histológico de criptas intestinais de animal iniciado pela DMH	26
Figura 5. Níveis de zinco no cólon e sangue dos animais nos diferentes grupos experimentais ao final das 4 semanas de experimento	27

Lista de Figuras

V. Artigo 2	37
Figura 1. Protocolo experimental sulfato de zinco (ZnSO₄)	33
Figura 2. Evolução do peso corpóreo médio dos animais nos diferentes grupos experimentais	34
Figura 3. Sobrevida dos animais nos diferentes grupos experimentais ao longo das 4 semanas de experimento	34
Figura 4. Níveis de zinco no cólon e sangue dos animais nos diferentes grupos experimentais ao final das 4 semanas de experimento	35
Figura 5. Níveis de zinco nas fezes nos diferentes horários após aplicação do ZnSO₄ nos animais	36

Lista de Tabelas

IV. Artigo 1	36
Tabela 1. Consumo estimado de ração e água, e ganho de peso corpóreo durante as 4 semanas de experimento.....	28
Tabela 2. Efeitos da exposição ao quelato de zinco (ZnGly) sobre o número e multiplicidade dos FCA	29
Tabela 3. Índice de marcação pelo PCNA nas células epiteliais do cólon nos diferentes grupos experimentais	30
Tabela 4. Índice de apoptose nas células epiteliais do cólon nos diferentes grupos experimentais	30

Lista de Tabelas

V. Artigo 2	37
Tabela 1. Consumo estimado de ração e água, e ganho de peso corpóreo	
durante as 4 semanas de experimento	37
Tabela 2. Peso do fígado dos animais ao final das 4 semanas	
de experimento	38
Tabela 3. Efeitos da exposição ao sulfato de zinco de zinco (ZnSO₄)	
sobre o número e multiplicidade de FCA	39
Tabela 4. Índice de marcação pelo PCNA nas células epiteliais	
do cólon nos diferentes grupos experimentais	40
Tabela 5. Índice de apoptose nas células epiteliais do cólon nos	
diferentes grupos experimentais	41

I.Revisão de Literatura

1.1 Câncer do cólon

O câncer do cólon é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo, e um dos principais responsáveis pelas mortes por neoplasias malignas, principalmente em países do ocidente (Parkin et al., 2001, 2005; INCA, 2010). A incidência e mortalidade por este tipo de câncer constituem importante problema de saúde pública, em especial em países desenvolvidos e áreas urbanas de países menos desenvolvidos. Sua incidência tende a aumentar pelo estilo de vida adotado pela população que inclui fatores nutricionais, como baixo consumo de minerais na alimentação (Willett et al., 1990; Ministério da saúde, 2003).

No mundo, os tumores malignos que acometem o cólon a cada ano somam cerca de 950 mil casos novos (Ministério da Saúde, 1999, 2005).

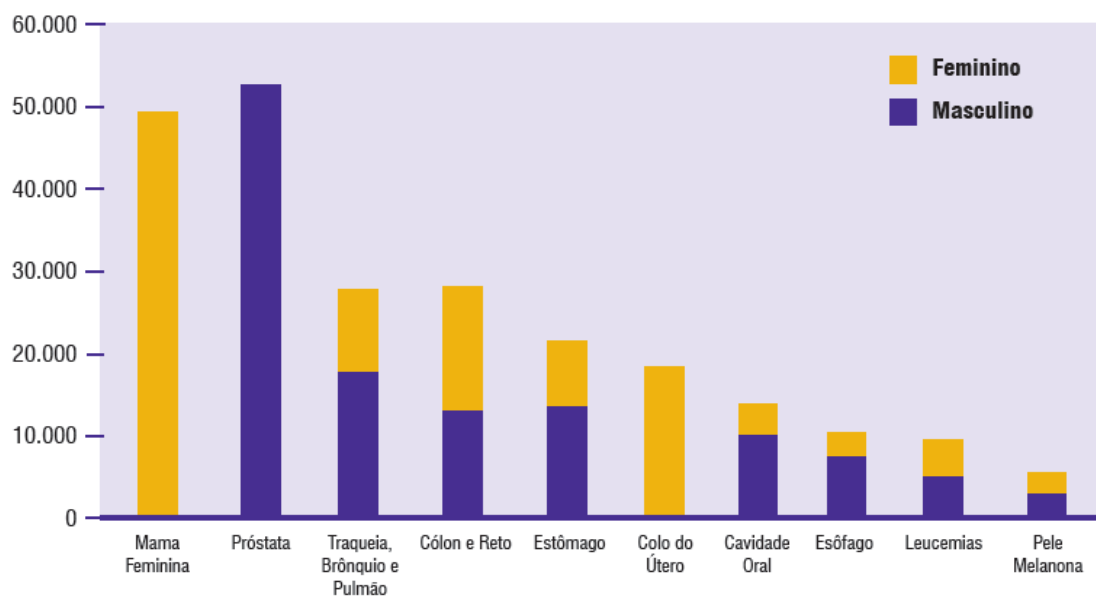
Nos estados Unidos, este tipo de neoplasia é considerado a terceira causa de morte por câncer (Jemal et al., 2003). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do câncer (INCA, 2010) figura entre as cinco primeiras causas de morte por câncer, e a distribuição percentual de tumores malignos de cólon e reto aproxima-se dos registros encontrados em países desenvolvidos, com aumento significativo de suas taxas de incidência ao longo das últimas décadas, principalmente nas regiões sul e sudeste. O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimado no ano de 2010 é de 13.310 casos em homens e de 14.800 em mulheres (**Tabela 1 e figura 1**). Estes valores correspondem a um risco estimado de 14 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, o câncer de cólon e reto foi o terceiro mais incidente (19 novos casos a cada 100.000 homens) entre a população masculina em 2010. Entre mulheres foi o segundo mais incidente (21 novos casos a cada 100.000 mulheres) (INCA, 2010).

Tabela 1. Estimativas do número de novos casos por tipo de câncer no ano de 2010, em homens e mulheres, segundo localização primária da neoplasia.*

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	52.350	-	52.350
Mama Feminina	-	49.240	49.240
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.800	9.830	27.630
Cólon e Reto	13.310	14.800	28.110
Estômago	13.820	7.680	21.500
Colo do Útero	-	18.430	18.430
Cavidade Oral	10.330	3.790	14.120
Esôfago	7.890	2.740	10.630
Leucemias	5.240	4.340	9.580
Pele Melanoma	2.960	2.970	5.930
Outras Localizações	59.130	78.770	137.900
Subtotal	182.830	192.590	375.420
Pele não Melanoma	53.410	60.440	113.850
Todas as Neoplasias	236.240	253.030	489.270

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Nº de Casos



Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA/ MS

Figura 1. Tipos de câncer com maior incidência na população brasileira feminina e masculina para o ano de 2010.

1.2 Carcinogênese experimental

O desenvolvimento de câncer ou carcinogênese, tal como analisado em modelos experimentais, é um processo dinâmico, de múltiplas etapas, que envolve alterações celulares, moleculares e morfológicas, sustentadas por modificações na expressão de genes que coordenam atividades essenciais da célula, como proliferação, diferenciação e apoptose (Pitot, 1989; Sugimura, 1992; Sequeira, 1997; Ochiai et al., 2003; Agner, 2003).

O processo de carcinogênese é extremamente complexo e dividido em pelo menos três etapas: iniciação, promoção e progressão (Dragan & Pitot, 1991).

A etapa de **iniciação** corresponde à interação do agente químico (iniciador) com o DNA da célula-alvo, o que leva ao dano permanente e irreversível do DNA. A eficiência da iniciação depende da replicação do DNA e divisão celular, subseqüentes a interação com o cancerígeno químico, o que “fixa” a alteração do genoma (Douglas, 2000).

Os cancerígenos químicos possuem átomos altamente reativos capazes de capturar elétrons de sítios nucleofílicos como DNA, RNA, proteínas e lipídeos em células-alvo específicas, o que resulta em alterações profundas que podem levar a célula a morte ou à aquisição de mutações em genes críticos que controlam o ciclo celular e apoptose (Schulte-Hermann et al., 1999; Baird et al., 2005).

Na **promoção**, as células geneticamente alteradas ou iniciadas sofrem um processo de expansão clonal. Nesta fase, a presença de substâncias cancerígenas promotoras ou não genotóxicas aceleram o desenvolvimento destas lesões proliferativas e o surgimento de lesões pré-neoplásicas. Experimentalmente, a etapa de promoção é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões tumorais benignas ou focos de células fenotipicamente alteradas, como os focos de criptas aberrantes (FCA) estudados em carcinogênese induzidas em cólon de ratos (Douglas, 2000). A multiplicação celular excessiva dos clones celulares possibilita

um maior acúmulo de mutações e instabilidade do DNA e o desenvolvimento de anaplasia que levam as células envolvidas à conversão maligna e evolução para a etapa seguinte da carcinogênese (Dragan & Pitot, 1991).

Na etapa de **progressão** do processo de carcinogênese, as células neoplásicas apresentam grau elevado de anaplasia, com elevados índices de proliferação e índices de apoptose reduzidos, caracterizando o fenótipo maligno (Dragan & Pitot, 1991). O agente promotor é dispensável nessa fase, pois as células que atingiram esse estágio de desenvolvimento tumoral são auto-suficientes aos estímulos para crescimento e multiplicação celular. O próximo passo dessas células é a infiltração da matriz extracelular e a disseminação por via linfática e vascular para outros tecidos do hospedeiro, caracterizando o potencial de invasão e metástases e conversão para célula maligna. As células malignas se tornam capazes de romper a lâmina basal endotelial, atravessar a parede vascular e cair em sua luz, onde podem circular para locais a distância e interagir com células do sistema imunológico (Robbins & Cotran, 2005).

Há evidências de que minerais presentes na alimentação apresentem papel importante nos estágios de iniciação, promoção e progressão do desenvolvimento neoplásico, destacando-se como importantes moduladores do risco ou de proteção contra o desenvolvimento de neoplasias específicas (Singh et al., 1992; Boehm et al., 1998; Jaiswal & Narayan, 2004; Dani et al., 2007).

1.3 Potencial quimioprotetor do zinco

O zinco (do alemão *Zink*) é um elemento químico de símbolo Zn, número atômico 30 (30 prótons e 30 elétrons) com massa atômica de 65,38 Da, ponto de fusão de 419,50°C e ponto de ebulição de 908°C. À temperatura ambiente, encontra-se no estado sólido e está situado no grupo 12 (IIB) da classificação periódica dos elementos. É um metal branco-azulado brilhante, estável ao ar seco e ocorre na natureza como 5 isótopos estáveis, ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn e ^{70}Zn . (Cantero, 1989; McCall & Huang, 2000; Azevedo & Chasin, 2003).

A primeira extração de fundição do metal impuro foi realizada na china, por volta do ano 1000 d.C, e no século XVII chegou a primeira barra de zinco ao Ocidente. No século XVIII, foi patenteado o processo de obtenção de zinco na Inglaterra a partir de Blenda (sulfureto de zinco), que é uma das bases do processo de destilação para obter o elemento (Azevedo & Chasin, 2003). Durante todo o século XX e início do XXI o papel do zinco tem sido amplamente estudado (Botti, 2001), e o conhecimento da sua importância para os organismos vivos começou quando Rolin em 1869, relatou que a presença desse metal era essencial para o crescimento do fungo *Aspergillus Niger* (Sayers, 1938). Em 1877, foi descrito a presença de zinco em músculo e fígados humanos, em seguida este elemento foi descrito em plantas e animais marinhos, e constatou-se que era um dos elementos mais importantes do organismo e essencial ao lactente, adulto e idoso (Shuttleworth, 1986; Cirino et al., 1987). Em 1939, a demonstração da participação do zinco na enzima anidrase carbônica provou que esse era um elemento fundamental a todas as espécies (Shuttleworth, 1986). Vários estudos se seguiram demonstrando a importância da suplementação do zinco na alimentação (Sandstead, 1999).

Este metal é considerado um oligoelemento, pois apresenta-se em quantidades diminutas no organismo, representando apenas 0,003% (1,4 a 2,3g) do corpo humano. (Tasman, 1992). É o segundo elemento-traço mais prevalente no organismo, apresentando-se

em grandes concentrações no cérebro, próstata, pele e seus anexos, fígado, pâncreas, ossos e sangue de mamíferos (Tasman, 1992; Weiss et al., 2001). Embora em quantidades tão reduzidas, o zinco é importante componente estabilizador de macromoléculas e membranas biológicas, sendo necessário em todas as fases da vida (Tasman, 1992).

Alimentação rica em minerais como o zinco é importante, pois apresentam componentes antioxidantes que podem exercer efeitos benéficos para a saúde humana (Kapil et al., 2004).

O impacto do câncer do cólon na saúde pública, tem proporcionado interesse na quimioprevenção, e os minerais presentes na alimentação podem ser agentes promissores na prevenção do câncer do cólon. Deste modo, alguns estudos sugerem que o câncer do cólon é fortemente influenciado por fatores nutricionais, incluindo a quantidade e composição de minerais na alimentação (Willett et al., 1990). O zinco é distribuído por todo o reino vegetal e animal em abundância em segundo lugar em relação ao ferro. Algumas das principais fontes de zinco estão apresentadas na **Tabela 2**.

A suplementação farmacológica é importante estratégia para combater a deficiência de zinco. Na **Tabela 3** encontram-se os compostos que podem ser utilizados como suplementos.

Tabela 2. Alimentos que contém zinco.

ALIMENTOS	ZINCO (mg/100g)
Cereais e derivados	
Arroz, branco, grão-médio, cozido	0,4
Aveia, flocos, crua	2,6
Cereal, mingau, milho, infantil	0,4
Cereal, matinal, milho	7,6
Farinha, Láctea de cereais	1,7

Verduras, Hortaliças e Derivados	
Espinafre, cru	0,5
Agrião, cru	0,7
Salsa, crua	1,3
Tomate, com semente, cru	0,3
Tomate, extrato	0,4
Frutas e Derivados	
Coco	0,9
Figo, enlatado, em calda	0,1
Maracujá	0,4
Pêssego, enlatado, em calda	0,1
Pescados	
Atum, fresco, cru	0,4
Bacalhau, salgado, cru	0,7
Sardinha	1,3
Porção de Peixes	0,7
Carnes e Derivados	
Carne, bovina, acém, moída, cozido	8,1
Carne, bovina, contra-filé, grelhado	6,7
Carne, bovina, costela de boi, assada	5,5
Carne, frango, fígado, crua	3,7
Leite e Derivados	
Leite, fluído 3,7% de gordura	0,4
Leite, vaca, integral, pó	2,7
Queijo mussarela	2,6
Ovo	
Ovo, galinha, cozido	1,0
Leguminosas e Derivados	
Feijão, Adzuki, cozido, com sal	1,8
Ervilha, enlatada, drenada	0,9

Fonte. Taco, 2004

Tabela 3. Compostos de zinco usados para suplementação.

Óxido de zinco	Estearato de zinco
Sulfato de zinco heptahidratado	Escorbato de zinco
Cloreto de zinco	Picolinato de zinco
Carbonato de zinco	Aminoato de zinco
Citrato de zinco	Zinco histidina
Gluconato de zinco	Zinco metionina

Fonte. Salgueiro, 2002.

O zinco é essencial na alimentação, pois atua na sobrevivência e função das células, de forma que age como co-fator de diversas enzimas que participam da replicação celular, combate aos radicais livres de oxigênio, manutenção da integridade do ácido dezoxirribonucleico, metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos. (Aggett, 1983; Prasad & Kucuk, 2002; Bargellini et al., 2003; Prasad, 2003). Estudos demonstraram que os processos oxidativos participam de vários estágios da carcinogênese e que micronutrientes como o zinco, podem apresentar papel na proteção contra neoplasias, em virtude de suas propriedades antioxidantes (Anetor et al., 2007). É provável que este mineral tenha função na inibição do crescimento e proliferação de diversos tipos de células tumorais, incluindo células do câncer do cólon (Iitaka et al., 2001; Park et al., 2002; Klein et al., 2006). A redução dos níveis de zinco na alimentação constitui um dos fatores de risco no desenvolvimento e progressão de tumores do cólon e reto (Song et al., 1993). Além disso, o zinco está envolvido em muitos aspectos da fisiologia celular, incluindo condições estruturais, funcionais e sinalizações de células, e a deficiência de zinco está associada ao retardo do crescimento, mudanças neurosensoriais e deficiências no sistema imunológico (Prasad & Kucuk, 2002).

O zinco é uma espécie atômica pequena e se comporta quimicamente como um ácido de Lewis, receptor de elétrons, o que determina a sua passagem pelas membranas biológicas tanto por mecanismos de difusão passiva quanto por transporte ativo (Salgueiro et al., 2000) (**Figura 2**). O zinco presente na alimentação é transferido do lúmen intestinal para o interior

do enterócito, ultrapassando a borda em escova, e depois para o sangue, onde se liga à albumina e, mais tarde se acumula no fígado, para redistribuição a outros órgãos (Cousins, 1985; Salqueiro et al., 2000). O transporte do zinco no trato gastrointestinal e na circulação sanguínea envolve transporte paracelular, sendo mediado por carreadores, (Salqueiro et al., 2000) como as proteínas intestinais ricas em cisteínas (CRIP's) e metalotioneínas (MTs), que se ligam ao zinco para transportá-lo a compartimentos intracelulares, auxiliando no processo de absorção, e proteínas da família ZnT localizadas na membrana basolateral dos enterócitos associadas ao efluxo deste metal (Hempe & Cousins, 1992; Vallee & Falchuk, 1993) (**Figura 2**).

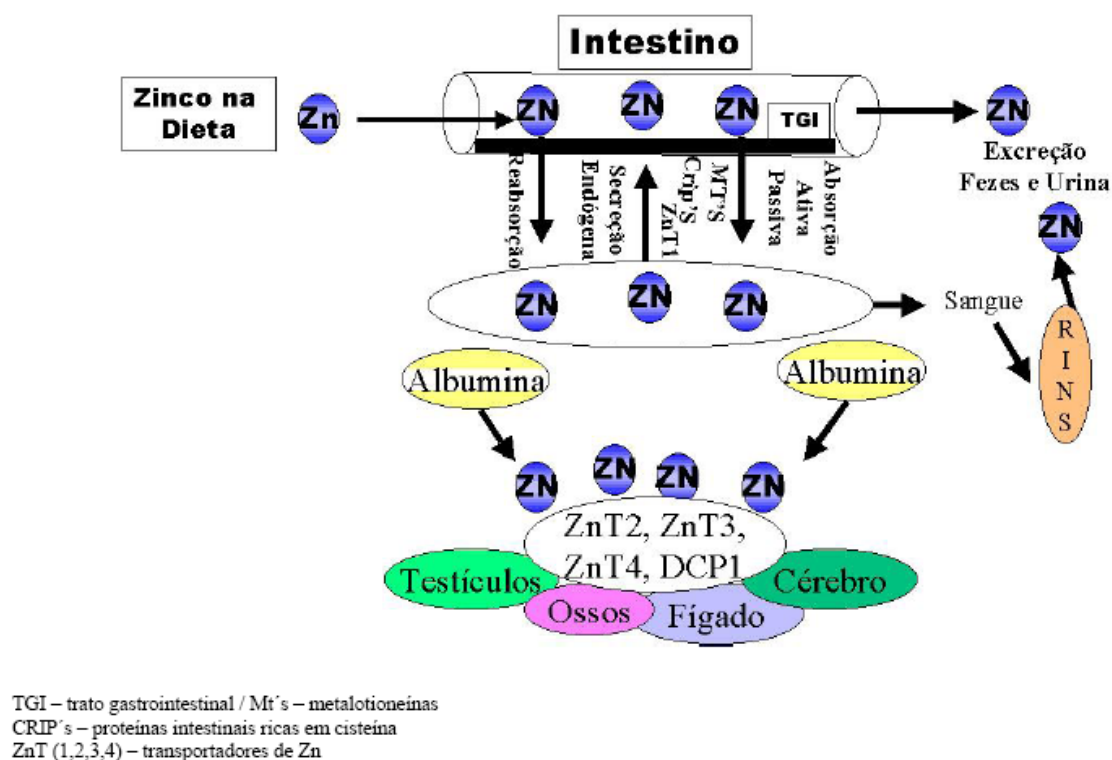


Figura 2. Mecanismos de absorção de zinco.

Fonte: [http://www.artigosZinco/biodisponibilidade do zn.mht](http://www.artigosZinco/biodisponibilidade%20do%20zn.mht)

O papel deste elemento, na manutenção da homeostase celular e na proteção de células contra influência do estresse é amplamente reconhecida (Fraker & Telford, 1997). O zinco pode contribuir para a manutenção da estrutura da barreira das membranas, desta forma, atua principalmente na defesa das células epiteliais da mucosa intestinal, que é frequentemente exposto à milhares de patógenos e agentes deletérios (Rdriguez et al., 1996; Sturniolo et al., 2001; Bao& Knoell, 2006). Segundo Sturniolo et al. (1998), pacientes com distúrbio crônico na permeabilidade intestinal apresentaram redução dos níveis de zinco na mucosa. Estudos anteriores demonstraram que a deficiência de zinco aumenta a permeabilidade da barreira da membrana endotelial, de células epiteliais do pulmão, e causa ulcerações no intestino (Mengheri et al., 1999; Canali et al., 2000).

Além de ser um componente do gene p53, um sensor do dano ao DNA que age para prevenir acúmulos de lesões genéticas, o zinco funciona como um catalisador de mais de 300 enzimas e mais de 2000 fatores de transcrição dependentes do metal envolvidos na expressão de genes de varias proteínas (Who, 2002; Ho et al., 2003).

O termo “dedos de zinco”, do inglês “zinc fingers”, é amplamente utilizado para identificar qualquer estrutura compacta que é estabilizada por íons de zinco, geralmente pequenas proteínas como a anidrase carbônica, fosfatase alcalina, álcool-desidrogenase, superóxido-dismutase, carboxipeptidase, ácido ribonucleico polimerase e transcriptase reversa, onde o zinco desempenha papel estrutural e funcional essenciais para a homeostase do organismo humano (Fascineli, 2001). Estas proteínas estão envolvidas nos processos de replicação e reparo, transcrição e translação, metabolismo e sinalização, proliferação celular e apoptose (Krishn et al., 2003).

Uma das funções de grande importância é a participação do zinco no sistema de defesa antioxidante (Kapil et al., 2004). O íon inibe as reações de propagação de radicais livres

devido à síntese de metalotioneínas (MT), proteínas citosólicas de baixo peso molecular (6.000 a 7.000 Da), que se ligam avidamente nos radicais, promovendo proteção (scavenger) contra danos em membranas celulares (Zowczak et al., 2001; Koury & Donangelo, 2003). As MT também estão associadas à detoxificação de metais pesados no organismo (Salqueiro et al., 2000; Zowczak et al., 2001; Koury & Donangelo, 2003). A interação direta do zinco com processos de transcrição gênica está relacionada aos promotores dos genes que codificam para as metalotioneínas, de maneira proporcional às concentrações de zinco no organismo disponível para exercer efeitos fisiológicos em tipos celulares específicos (Henriques et al., 2003). O estado nutricional relativo ao zinco também está relacionado a mecanismos diretos de modulação da expressão gênica, a partir da modulação da atividade enzimática ou de moléculas sinalizadoras que dependem da ligação do zinco (Henriques et al., 2003).

O zinco é componente estrutural da superóxido-dismutase (SOD), enzima presente no citoplasma de todas as células e que catalisa a conversão de dois radicais, o íon superóxido e peróxido de hidrogênio, reduzindo a toxicidade das espécies reativas do oxigênio. A SOD intracelular encontra-se em níveis reduzidos em situações de deficiência de zinco (Powell, 2000; Koury & Donangelo, 2003; Tapieiro & Tew, 2003).

Além da atividade antioxidante, este micronutriente é indispensável para atividades de enzimas envolvidas diretamente com a síntese de DNA e RNA e, parece ter efeito modulador e protetor para o crescimento de células neoplásicas (Mafra & Cozzolino, 2004; Wu et al., 2004).

Diferente dos outros metais de transição do quarto período da classificação periódica dos elementos, o íon zinco (Zn^{2+}) possui um orbital *d* cheio (d^{10}), o que impossibilita a sua participação em reações de óxido-redução em que necessariamente, há uma dinâmica de trocas de elétrons entre o par iônico, mas permite que seja oceptor de um par de elétrons

(Butler, 1998). Portanto o zinco é o íon metálico ideal para funcionar como co-fator em reações que necessitam de um íon redox-estável, comportando-se quimicamente como um ácido de Lewis durante a catálise (Butler, 1998). Por apresentar preenchimento dos orbitais “d”, a energia de estabilização do campo ligante dos íons Zn^{2+} é igual a zero em todas as geometrias de ligação encontradas, o que faz com as geometrias sejam estáveis. Apesar de o metal assumir preferencialmente a geometria tetraédrica, com número de coordenação 4, este pode variar de 2 a 6, com suas respectivas geometrias, as quais vão desde a forma tetraédrica regular ou distorcida até a forma octaédrica. A nulidade de efeitos de campos ligantes contribui para que o zinco apresente tais configurações. A ausência de uma barreira energética e a multiplicidades de geometrias de coordenação, permite que as enzimas dependentes de zinco alterem a reatividade do íon metálico e conseqüentemente aumentem a habilidade em catalisar transformações químicas, acompanhadas de mudanças em sua geometria de coordenação (Kaim & Schwederski, 1996; Butler, 1998; Dhawan et al., 2006).

Os minerais quelatados são definidos por Leeson & Summers, (1997) como produtos resultantes da reação de um íon metálico com composto orgânico, como aminoácido, o qual funciona como carreador e possui a capacidade de se ligar ao metal por ligações covalentes através de grupamentos aminos ou oxigênio, formando uma estrutura cíclica, como na reação que ocorre com o zinco complexado à glicina (ZnGly). Esses ligantes ou quelantes tem o papel de aumentar a absorção e a disponibilidade do mineral no organismo (Ensminger & Oldfield, 1990). A palavra “quelato” vem do grego “*chele*” que significa “garra” ou “pinça”, um termo adequado para descrever a forma pelo qual os íons metálicos polivalentes são ligados aos compostos orgânicos (Mellor, 1964).

Alguns autores sugerem que os minerais quelatados são melhor absorvidos pela célula epitelial do intestino do que os inorgânicos, como o sulfato de zinco (ZnSO_4) pois utilizam as vias de absorção das moléculas orgânicas que a eles estão ligados (Kratzer & Vohra, 1996).

Não há estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a ação do zinco complexado a glicina (ZnGly) em modelos experimentais da carcinogênese do cólon. Assim é de extrema importância que sejam feitas investigações sobre os possíveis efeitos quimioprotetores do quelato de zinco na carcinogênese do cólon.

Finley et al. (1995) sugerem que o zinco na forma de sulfato de zinco (ZnSO_4) é adequado para estudar os possíveis efeitos quimioprotetores do zinco no processo de carcinogênese do cólon, pois relatam que o zinco iônico livre é capaz de difundir-se através da célula, enquanto o zinco complexado não. Dani et al. (2007) demonstraram efeito positivo do potencial quimioprotetor do zinco na forma de sulfato de zinco (ZnSO_4) em modelo experimental de câncer do cólon em roedores.

Assim, é importante que sejam feitas investigações comparando o potencial quimioprotetor do zinco na forma de quelato de zinco (ZnGly) e de sulfato de zinco (ZnSO_4) no processo de carcinogênese do cólon induzido pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em roedores.

1.4 Modelo experimental da carcinogênese do cólon

Modelos experimentais com a utilização de cancerígenos químicos são adotados para estudar aspectos da carcinogênese do cólon que não podem ser analisados em seres humanos. Os estudos experimentais permitem a observação detalhada das alterações que precedem o aparecimento da neoplasia maligna em nível macroscópico e histológico (Chang, 1978, 1982, 1984; Mayer et al., 1987).

Em 1967, Druckrey et al. demonstraram que a administração parenteral de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) resultou no desenvolvimento de câncer, tanto no intestino delgado quanto no cólon de ratos. Todos os animais desenvolveram neoplasias e o cancerígeno mostrou-se seletivo em seus efeitos, pois foram encontradas somente neoplasias intestinais. A partir de então, a DMH tem sido amplamente utilizada em pesquisas de carcinogênese do cólon para o estudo de vários aspectos da morfologia, patogênese, prevenção e tratamento desta neoplasia (Martin et al., 1973; Sunter et al., 1978; Sequeira, 1997).

A DMH é um composto químico genotóxico com alto grau de especificidade para a mucosa do cólon, em varias espécies de roedores. É um cancerígeno completo que induz iniciação e promoção da carcinogênese, e leva a formação de neoplasias, visíveis macroscopicamente, de forma dose dependente (Rogers, 1985; Rodrigues et al., 2002). Para os experimentos de carcinogênese do cólon têm sido utilizadas preferencialmente a via subcutânea e intraperitoneal (Martin et al., 1973; Richards, 1977). A DMH induz grande número de tumores no cólon de roedores, semelhantes aos tumores de cólon humano (Martin et al., 1973; Richards, 1977).

A Ativação metabólica da DMH pelo organismo envolve sua oxidação no fígado, originando o azometano, que sofre segunda oxidação e gera azoximetano. Este último, após hidroxilação por enzimas microssômicas hepáticas, resulta em metilazoximetanol, o qual é

conjugado em ácido glicurônico e secretado pela bile. Ao atingir o intestino sofre hidrólise por β -glicuronidases produzidas pelas bactérias intestinais formando novamente metilazoximetanol, que sofre oxidação convertendo na forma instável metilazoxiformaldeído. Este sofre decomposição formando finalmente o íon carbônico, que é capaz de metilar DNA, RNA ou proteínas de células intestinais (Matsumoto & Higa, 1966; Weisburger, 1971; Lamont & O' Gorman, 1978; Sonh et al., 1991). Alguns autores sugerem que a DMH e seus metabólitos hepáticos podem ser transportados até as células epiteliais do cólon via corrente sanguínea, e serem secretados pela bile (Zedek et al., 1977).

A **Figura 3** demonstra o esquema da biotransformação da DMH.

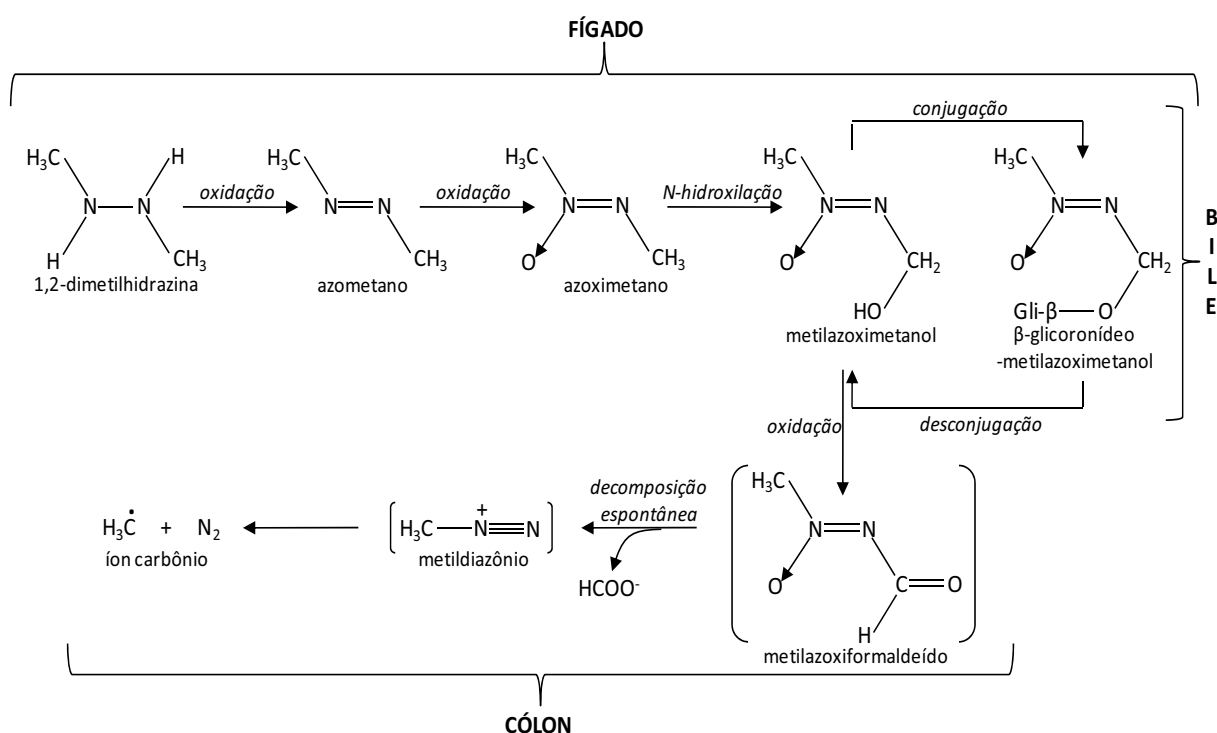


Figura 3- Biotransformação da 1,2-dimetilhidrazina

1.5 Focos de criptas aberrantes (FCAs)

O desenvolvimento de câncer do cólon em roedores envolve uma série de alterações patológicas, compreendendo desde lesões pré-neoplásicas da mucosa, como os focos de criptas aberrantes (FCA), até o desenvolvimento de lesões neoplásicas malignas (Bird, 1995; Takayama et al., 1998).

Os FCAs são biomarcadores morfológicos intermediários do câncer do cólon e indicadores de indução neoplásica precoce (McLellan & Bird, 1988; Bird, 1995; Park et al., 1997). As criptas aberrantes (CA) foram primeiramente descritas por Bird (1987) no cólon de roedores tratados com cancerígenos químicos e, posteriormente em humanos, por Pretlow et al. (1991), no cólon de pacientes portadores de adenocarcinomas. As criptas aberrantes podem ser identificadas na mucosa do cólon, como únicas ou na forma de focos, sendo designados de FCA (Tudek et al., 1989). Os FCAs são observados com maior frequência no cólon médio e distal, tanto em roedores como no homem (Di Gregorio et al., 1997; Rodrigues et al., 2002). Em roedores, as criptas aberrantes são induzidas por compostos químicos genotóxicos e não genotóxicos (McLellan & Bird, 1988a, b; Bird, 1995; Whiteley et al., 1996). Os cancerígenos químicos mais utilizados para a indução de FCA no cólon de roedores são a DMH e seu metabólito, o azoximetano (AOM) (Rodrigues et al., 2002).

A gênese de FCAs provavelmente começa com única célula iniciada, e através da expansão clonal, leva a alteração na morfologia das criptas (Chang, 1984). Inicialmente surge como criptas isoladas e, com o tempo FCAs com mais de uma cripta por foco são observadas. As novas criptas, geralmente, derivam de criptas aberrantes formadas anteriormente (Bird & Good, 2000). Assim, a multiplicidade de criptas é um parâmetro importante para avaliar a progressão dos FCAs em estudos de carcinogênese experimental, bem como entender a patogênese do câncer do cólon (Cheng & Lai, 2003).

Na mucosa do cólon de animais tratados com cancerígenos químicos as criptas aberrantes são revestidas por células epiteliais com diferentes graus de maturação celular e displasia (Bird, 1995). Do ponto de vista experimental, a análise de FCAs é fundamental para se investigar alterações moleculares muito precoces na carcinogênese do cólon (Ochiai et al., 2003; Stevens, 2007). Este tipo de lesão pré-neoplásica consiste em criptas que evoluem cronologicamente com fenômenos proliferativos, hiperplásicos, displásicos e pequenos adenomas que podem evoluir para adenocarcinomas (Montenegro et al., 2003; Murilo et al., 2004). Além disso, foi observado que os FCAs apresentam mudanças no padrão de atividade enzimática, como redução das taxas da hexosaminidase (Barrow et al., 1990; Pretlow et al., 1990, 1993) e da produção de mucinas, com aumento de sialomucinas e perda de sulfomucinas, fenômeno geralmente associado ao grau de displasia e multiplicidade das criptas (Uchida et al., 1997; Sandforth et al., 1988; Femia et al., 2004).

Estudos anteriores demonstraram alterações genéticas nos FCAs, tais como mutações nos genes K-ras, APC e TP53, relacionadas à proliferação celular, presença de instabilidade de microssatélites, um sensor de dano ao sistema de reparo do DNA e alterações em genes associados à inflamação tais como o INOS e COX-2 (Smith et al., 1994; Heinen et al., 1996; Nucci et al., 1997; Takahashi & Wakabayashi, 2004). Os FCAs com maior grau de displasia podem apresentar acúmulo citoplasmático e nuclear de β -catenina, que é um marcador potencial de progressão neoplásica (Yamada et al., 2000, 2003; Hata et al., 2004).

Tem sido proposto que o número total, a distribuição e a multiplicidade dos FCAs correlacionam-se com a incidência de tumores do cólon (Bird, 1987; Mc Lellan & Bird, 1988; Tudek et al., 1989; Magnuson et al., 1993). Há evidências de que o FCA é importante ferramenta nos estudos de agentes quimioprotetores ou quimiopreventivo do desenvolvimento neoplásico, induzido por cancerígenos químicos (Stevens, 2007).

II. Referências Bibliográficas *

***UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. Editora Unesp. Normas para publicações da Unesp. São Paulo: Ed. Unesp, 1994. 4v., v.2: Referências Bibliográficas.**

II. Referências bibliográficas

- Aggett PJ. Acrodermatitis enteropathica. *J Inherit Metab Dis*. 1983; 1: 39-43.
- Agner AR. Atividade do extrato urucum sobre a Cacinogênese hepática e de cólon em ratos Wistar [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2003.
- Anetor JL Wanibuchi H, Fukushima S. Arsenic exposure and its health effects and risk of cancer in developing countries: micronutrients as host defence. *Asian Pacific J Cancer*. 2007; 8: 13-23.
- Azevedo FA, Chasin AAM. Metais: Gerenciamento da toxicidade. São Paulo: Atheneu; 2003.
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon -DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutag*. 2005; 45: 106-14.
- Bao S, Knoell DL. Zinc modulates cytokine-induced lung epithelial cell barrier permeability. *Am J Physiol lung Cell Mol Physiol*. 2006; 291: 1132-41.
- Bargellini A, Piccinini L, DE Palma M, Giacobazzi P, Scaltriti S, Mariano M, et al. Trace elements, anxiety and immune parameters in patients affected by cancer. *J Trace Elem Med Biol*. 2003; 17: 3-9.
- Barrow BJ, O' Riordan MA, Stellato TA, Calkins BM, Pretlow TP. Enzyme-altered foci in colons of carcinogen-treated rats. *Cancer Res*. 1990; 50: 1911-6.
- Bird RP, Good CK. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett*. 2000; 112-3.
- Bird RP. Observation and qualification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*. 1987; 37: 147-51.

- Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* 1995; 93: 55-71.
- Boehm T, O'Reilly MS, Keough K, Shiloach J, Shapiro R, Folkman J. Zinc binding of endostatin is essential for its antiangiogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 252: 190-4.
- Botti AS. Avaliação dos potenciais evocados auditivos de tronco cerebral em pacientes portadores de deficiência crônica de zinco por síndrome do intestino curto [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.
- Butler A. Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms. *Sci Am.* 1998; 281: 207-9.
- Canali R, Vignolini F, Nobili F, Mengheri E. Reduction of oxidative stress and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) expression by red wine polyphenols in zinc deficiency induced intestinal damage of rat. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28:1661-70.
- Cantero BB. Estudio sobre el mecanismo de acción del zincum metalico. *Homeopat Méx.* 1989; 2-14.
- Chang WWL. Histogenesis of colon cancer in experimental animals. *Scand J Gastroenterol.* 1984; 104: 27-43.
- Chang WWL. Histogenesis of symmetrical 1,2 dimethylhydrazine-induced neoplasms of colon of mouse. *J Natl Cancer Inst.* 1978; 60: 1405-18.
- Chang WWL. Morphological basis of multistep process in experimental colonic carcinogenesis. *Virchows Arch Cell Pathol.* 1982; 41:17-37.

- Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2003; 9: 2642–9.
- Cirino CG, Rached SLS, Nunes AB, Faria Filho M. Acrodermatite enteropática: a propósito de um caso. *CCS*. 1987; 9: 17-20.
- Cousins RJ. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev*. 1985; 65: 238-309.
- Dani V, Goel A, Vaiphei K, Dhawan DK. Chemopreventive potential of zinc in experimentally induced colon carcinogenesis. *Toxicol let*. 2007; 171: 10-8.
- Dhawan DK, Sen T, Dani V. Effectiveness of Zinc in modulating the CCl₄ induced oxidative stress in rat liver. *Toxicol Mech Method*. 2006; 16: 37-40.
- Di Gregorio C, Losi L, Fante R, Modica S, Ghidoni M, Pedroni M, et al. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology*. 1997; 30: 328-34.
- Douglas CR. Patofisiologia geral: mecanismo da doença. São Paulo: Robe Editorial; 2000.
- Dragan YP, Pitot HC. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Faseb J*. 1991; 5: 2280-6.
- Druckrey H, Preussmann R, Matzkies F, Ivankovic S. Selective production of intestinal cancer in rats by 1,2-dimethylhydrazine. *Naturwissenschaften*. 1967; 54: 285-6.
- Ensminger ME, Oldfield JE. *Feeds & Nutrition*. 2th ed. Califórnia: Ensminger Publishing Company; 1990.
- Fascineli ML. Estudo da ação do zinco na teratogenicidade produzida pelo arsênio em camundongos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulisa; 2001.

- Femia AP, Dolara P, Caderni G. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoximethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 277-81.
- Finley JW, Briske AM, Reeves PG, Johnson LK. Zinc uptake and transcellular movement by CACO-2 cells: studies with media containing fetal bovine serum. *J Nutr Biochem*. 1995; 6: 137-44.
- Fraker PJ, Telford WG. A reappraisal of the role of zinc in life and death decisions of cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997; 215: 229-36.
- Hardman WE, Cameron IL, Heitman DW, Contreras E. Demonstration of the need for end point validation of putative biomarkers: Failure of aberrant crypt foci to predict colon cancer incidence. *Cancer Res*. 1991; 51: 6388-92.
- Hata K, Yamada Y, Kuno T, Hirose Y, Hara A, Qiang SH, et al. Tumor formation is correlated with expression of B-catenin-accumulated crypts in azoximethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Sci*. 2004; 95: 316-20.
- Heinen CD, Shivapurkar N, Tang Z, Groden J, Alabaster O. Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res*. 1996; 56: 5339-41.
- Hempe JM, Cousins RJ. Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats. *J Nutr*. 1992; 122: 89-95.
- Henriques GS, Hirata MH, Cozzolino SMF. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da Enzima Conversora da Angiotensina. *Rev Nutr*. 2003; 16: 333-45.

- Ho E, Courtemanche C, Ames BN. Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increased p53 expression in human lung fibroblasts. *J Nutr.* 2003; 133: 2543.
- Iitaka M, Kakinuma S, Fujimaki S. Introduction of apoptosis and necrosis by zinc in human thyroid cancer cell lines. *J Endocrinol.* 2001; 169: 417-24.
- Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de 2010: Incidência de Câncer no Brasil [Internet] Rio de Janeiro: INCA; 2010 [acesso 10 maio 2010]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.
- Jaiswal AS, Narayan S. Zinc stabilizes adenomatous polyposis coli (APC) protein levels and induces cell cycle arrest in colon cancer. *J Cell Biochem.* 2004; 93: 345-57.
- Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer Statistics, 2003. *CA Cancer J Clin.* 2003; 53: 5-26.
- Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res.* 1994; 54: 5523-26.
- Kaim W, Schwederski B. Zinc: structural gene-regulatory functions and the enzymatic catalysis of hydrolysis or condensation reactions. In: Kaim W, Schwederski B, editors. *Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life, an introduction and guide*. West Sussex: Wiley; 1996. p. 242-64.
- Kapil U, Singh P, Shukla NK, Pathak P, Singh R. Association of vitamin A, vitamin C and zinc with laryngeal cancer. *Indian J Cancer.* 2004; 40: 67-70.
- Klein C, Creach K, Irintcheva V, Hughes KJ, Blackwell PL, Corbett JA, et al. Zinc induces ERK-dependent cell death through a specific Ras isoform. *Apoptosis.* 2006; 11: 1933-44.

- Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr.* 2003; 16: 433-41.
- Kratzer FH, Vohra P. Chelates and chelation. In: Kratzer FH, Vohra. P. Chelates in nutrition. Boca Raton: CRC Press; 1996. p. 5-33.
- Krishn SS, Mamjumbar I, Grishin NV. Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 532-50.
- Lamont JT, O’Gorman TA. Experimental colon cancer. *Gastroenterology.* 1978; 75: 1157-69.
- Leeson S, Summers JD. Commercial poultry nutrition. 2 th ed. Guelph Ontario: University Books; 1997. p. 57-58.
- Mafrá D, Cozzolino SMF. Importância do zinco na nutrição humana. *Rev Nutr* 2004; 17: 797.
- Magnuson BA, Carr I, Bird RP. Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Res.* 1993; 53: 4499-504.
- Martin MS, Martin F, Michiels R, Bastien H, Justrabo E, Bordes M, et al. An experimental model for cancer of the colon and rectum. Intestinal carcinoma induced in the rat 1,2-dimethylhydrazine. *Digestion.* 1973; 8: 22-34.
- Matsumoto H, Higa HH. Studies on methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin: methylation of nucleic acids in vitro. *Biochem J.* 1966; 98: 20-2.
- Mayer D, Trocheris V, Hacker HJ, Villard V, Murat JC, Bannasch P. Sequential Histochemical and morphometric studies on preneoplastic and neoplastic lesions induced in rat colon by 1,2 dimethylhydrazine. *Carcinogenesis.* 1987; 8:155-61.
- McCall KA, Huang C, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr.* 2000; 130: 1437-46.

- McLellan EA, Bird RP. Specificity study to evaluate induction of aberrant crypts in murine colon. *Cancer Res.* 1988a; 48: 6183-6.
- McLellan EA, Bird RP. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesion in the murine colon. *Cancer Res.* 1988b; 48: 6186-92.
- Mellor D. Historical background and fundamental concepts "of chelation". In: Dwyer F, Mellor D. *Chelating agents and metal chelates*. New York: Academic Press; 1964. p.1.
- Mengheri E, Nobili F, Vignolini F, Peseni M, Brandi G, Biavati B. *Bifidobacterium animalis* protects intestine from damage induced by zinc deficiency in rats. *J Nutr.* 1999; 129: 2251-7.
- Ministério da Saúde. Estimativa de 2006: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2005.
- Ministério da Saúde. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 1999.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. *Falando sobre câncer de intestino*. Brasília: INCA; 2003. p.11.
- Montenegro MA, Negrette MS, Lertora WJ, Catuogno MS. Focus de criptas displásicas inducidas com 1,2 dimetilhidrazina em intestino grosso de ratas tratadas com molibdeno y tungsteno. *Rev Vet.* 2003; 14:1.
- Munger RG, Folsom AR, Kushi LH, Kaye SA, Sellers TA. Dietary assessment of older Iowa women with a food frequency questionnaire: nutrient intake, reproducibility, and comparison with 24-hour dietary recall interviews. *Am J Epidemiol.* 1992; 136: 192–200.

- Murilo G, Choi JK, Pan O, Contantinou AL, Mehta RG. Efficacy of garbanzo and soybean flour in suppression of aberrant crypt foci in the colons of CF-1 mice. *Anticancer Res.* 2004; 24: 3049-55.
- Nucci MR, Robinson CR, Longo P, Campbell P, Hamilton SR. Nucci MR, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci human colorectal mucosa. *Hum Pathol.* 1997; 28:1396-407.
- Ochiai M, Ushingome M, Fujiwara K, Ubagai T, Kawamori T, Sugimura T, et al. Caracterização of dysplatic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenyllimidazo [4,5-b] pyridine. *Am J Pathol.* 2003; 163: 1607-14.
- Park HS, Goodlad RA, Wright NA. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site specific manner and depends on tumor histology. *Cancer Res.* 1997; 57: 4507-10.
- Park KS, Ahn Y, Kim JA, Yun MS, Seong BL, Choi ky. Extracellular zinc stimulates ERK-dependent activation of p21 Cip/WAF1 and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. *Br J Pharmacol.* 2002; 137: 597-607.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55: 74-108.
- Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001; 2: 533-43.
- Pitot HC. Progression: The terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res.* 1989; 80: 599-607
- Powell S R. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr.* 2000; 130: 1447-54.
- Prasad AS, Kucuk O. Zinc in cancer prevention. *Cancer Metastasis Rev.* 2002; 21: 291-5.

Prasad AS. Zinc and immunity. *Mol Cell Biochem.* 1998; 188: 63-9.

Prasad AS. Zinc deficiency. *BMJ.* 2003; 326: 409-10.

Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Juncisek JA, et al. Aberrant crypts: Putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* 1991; 51: 1564-7.

Pretlow TP, O' Roirdan A, Somich GA, Amini SB, Pretlow TG. Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated With azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis.* 1992; 13:1509-12.

Pretlow TP, O'Riordan MA, Kolman MF, Juncisek JA. Colonic aberrant crypts in azoximethane-treated F334 rats have decreased hexosaminidase activity. *Am J Pathol.* 1990; 136: 13-26.

Pretlow TP, O'Riordan MA, Spancake KM, Pretlow TG. Two types of putative preneoplastic lesions identified by hexomedinidase activity in whole-mounts of colons from F344 rats treated with carcinogen. *Am J Pathol.* 1993; 142: 1695-700.

Richards TC. Early changes in the dynamics of crypts cell populations in mouse colon folowing administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 1977; 37: 1680-5.

Robbins SL, Cotran RS. Bases patológicas das doenças. 7th ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2005.

Rodrigues MA, Silva LA, Salvadori DM, De Camargo JL, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short-and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35: 351-5.

- Rodrigues MAM, Sequeira JL. Modelos experimentais de câncer de cólon. apud: Rhoden EL, Rhoden CR, editores. Princípios e técnicas em experimentação animal. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2006. p. 299-313.
- Rodriguez P, Darmon N, Chappuis P, Candalh C, Blaton MA, Bouchaud C, et al. Intestinal paracellular permeability during malnutrition in guinea pigs: effect of high dietary zinc. *Gut*. 1996; 39: 416-422.
- Rogers JE, Li SW. Effect of metals and other inorganic ions on soil microbial activity:soil dehydrogenase assay as a simple toxicity test. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1985; 34: 858-65.
- Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, De Paoli T, et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr Res*. 2000; 20: 737-55.
- Salgueiro M, Zubillaga M, Lysionek A, Caro R, Weill R, Boccio J. Strategies to combat zinc and iron deficiency. *Nutr Rev* 2002; 60: 52-8.
- Sandforth F, Heimpel S, Balzer T, Gutschmidt S, Riecken EO. Characterization of stereomicroscopically identified preneoplastic lesions during dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. *Eur J Clin Invest*. 1988; 18: 655-662.
- Sandstead HH. Understanding zinc: recent observations and interpretations. *J Lab Clin Med*. 1999; 124: 322-7.
- Sayers RR. Metal fume fever. *Public Health Rep* 1938; 53 -1080.
- Schulte-Hermann R, Bursch W, Marian B, Grasl-Kraupp B. Active cell death (apoptosis) and cellular proliferation as indicators of exposure to carcinogens *IARC Sci Publ*. 1999; 146: 273-85.

- Sequeira JL. Influência do processo de reparação de feridas cutâneas na carcinogênese química experimental do cólon no rato [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1997.
- Shuttleworth VS. Zinc - in perspective. T Br Homoeopath J. 1986; 75: 69-74.
- Singh KP, Zaidi SIA, Raisuddin S, Saxena AK, Murthy RC, Ray PK. Effect of zinc on immune functions and host resistance against infection and tumor challenge. Immunopharmacol Immunotoxicol. 1992; 14: 813-40.
- Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, et al. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. Cancer Res. 1994; 54: 5527-30.
- Sohn OS, Ishizaki H, Yang CS, Fiala ES. Metabolismo of axoxymethane, methylazoxymethanol and N-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. Carcinogenesis. 1991; 12:127-31.
- Song MK, Heng MC, Rolandelli R, Ament ME, Heng MK. Pssible link between zinc intake and colon cancer. J Natl Cancer Inst. 1993; 85: 667-9.
- Stevens RG, Swede H, Heinen C, Jablonski M, Grupka M, Ross B, et al. Aberrant crypt foci in patients with a positive family history of sporadic colorectal cancer. Cancer Lett. 2007; 248: 262-8.
- Sturniolo GC, Di Leo V, Ferronato A, D'Odorico A, D'Inca' R. Zinc supplementation tightens "leaky gut" in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2001; 7: 94-8.

- Sturniolo GC, Mestriner C, Lecis PE, D'odorico A, Venturi C, Irato P, et al. Altered plasma and mucosal concentrations of trace elements and antioxidants in active ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 1998; 33: 664-49.
- Sugimura T. Mutistep carcinogenesis: a 1992 perspective. *Science.* 1992; 258: 603-7.
- Sunter JP, Appleton DR, Wright NA, Watson AJ. Pathological features of the colonic tumours induced in rats by the administration of 1.2-dimethylhydrazine. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1978; 21: 211-23.
- Sutherland LA, Bird RP. The effect of chenodeoxycholic acid on the development of aberrant crypt foci in the rat colon. *Cancer Lett.* 1994; 76: 101-7.
- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação (NEPA). Universidade de Campinas, UNICAMP. Disponível em URL: [http:// www.unicamp.br/nepa/taco](http://www.unicamp.br/nepa/taco)
- Takahashi M, Wakabayashi K. Gene mutations and altered gene expression in azoximethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.* 2004; 95: 475-80.
- Takaiaama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, et al. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1277-84.
- Tapieiro H, Tew KD. Trace elements un human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Phamacother.* 2003; 57: 399-11.
- Tasman - Jones C. Distúrbios no metabolismo de oligoelementos. In: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennet JC. *Tratado de Medicina Interna.* 19 th ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992. Cap 1, p.1204-7.

- Tudek B, Bird RP, Bruce WR. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res.* 1989; 49: 36-1240.
- Uchida K, Kado S, Onoue M, Tohyama K. Relationship between the nature of mucus and crypt multiplicity in aberrant crypt foci in the rat colon. *J Cancer Res.* 1997; 88: 807-14.
- Valle BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 1993; 73:79-118.
- Weisburguer JH. Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer.* 1971; 28: 60-70.
- Weiss JH, Sensi SL, Koh JY. Zn²⁺: A novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *TIPS.* 2001; 21: 395-401
- Whiteley LO, Hudson LJR, Pretlow T. Aberrant crypt foci in the colonic mucosa of rats treated with a genotoxic and non-genotoxic colon carcinogen. *Toxicol Pathol.* 1996; 24: 681-9.
- Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med.* 1990; 323:1664–72.
- World Health Organization. The World Health Report-Reducing Risk Promoting healthy Life. Geneva: WHO; 2002.
- Wu T, Sempos CT, Freudenheim JL, Muti P, Smit E. Serum Iron, Copper and Zinc Concentrations and Risk of Câncer Mortality in US Adults. *Ann Epidemiol.* 2004; 14: 195-201.

- Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y, Hayashi R, Maruyama K, Maesawa C, et al. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 2000; 60: 4761-6.
- Yamada Y, Mori H. Pre-cancerous lesions of colorectal cancers in rodents: a new concept. *Carcinogenesis.* 2003; 24:1015-9.
- Zedek MS, Grab DJ, Sternberg SS. Differences in the acute response of the various segments of rat intestine to treatment with the intestinal carcinogen methylazoxymethanol acetate. *Cancer Res.* 1977; 37: 32-6.
- Zowczak M, Iskra M, Torlinski L, Cofta S. Analysis of Serum Copper and Zinc Concentrations in Cancer Patients. *Biol Trace Elem Res.* 2001; 82: 1-8.

III. *Objetivos gerais*

III. Objetivos gerais

O presente estudo foi delineado com a finalidade de investigar o possível efeito quimiprotetor do zinco na forma de quelato (ZnGly), administrado por via oral ou de sulfato (ZnSO_4), administrado por via oral e intraperitoneal, no processo de carcinogênese do cólon, em modelo de carcinogênese induzido pela 1,2-dimetilhidrazina em ratos Wistar machos.

IV. *Artigo 1* *

De acordo com as normas da revista **Toxicology Letters**.

Investigação do possível efeito quimioprotetor do quelato de zinco (ZnGly) administrado por via oral, na etapa de iniciação da carcinogênese do cólon induzida pela 1,2-Dimetilhidrazina no rato.

Flávia R. Moraes da Silva ^a, Maria A. Marchesan Rodrigues ^a, Luis F. Barbisan ^{b,*}

^a Universidade Estadual Paulista-UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Patologia, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil

^b Universidade Estadual Paulista-UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Morfologia, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil

**Endereço para correspondência:*

Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, Ph.D.

Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, 18618-970, SP, Brasil.

Telefone/Fax: +55 14 3811 6238 ramal 236.

E-mail: mariam@fmb.unesp.br

Revista sugerida: **Toxicology Letters**, ISSN: 0378-4274

1. Resumo

O presente estudo foi delineado para investigar a possível ação quimioprotetora do quelato de zinco (ZnGly), na etapa de iniciação da carcinogênese do cólon, induzida pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos Wistar machos. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais e receberam três doses de 40mg/Kg, via subcutânea (sc) de DMH ou EDTA (veículo da DMH) e 15mg/Kg de quelato de zinco (ZnGly) por gavagem durante quatro semanas. Após a narcose foram coletadas amostras de sangue e, em seguida fragmentos do cólon para dosagens de zinco. O cólon foi removido inteiro, fixado em formalina tamponada a 10%, corado com azul de metileno para análise de incidência de focos de criptas aberrantes (FCAs) e processado histologicamente para análise dos índices de proliferação celular e apoptose. A exposição à DMH aumentou significativamente os índices de proliferação celular e apoptose na mucosa do cólon. A administração do quelato de zinco (ZnGly) não alterou o número e multiplicidade de FCAs e não modificou as taxas de proliferação celular e de apoptose da mucosa do cólon, tanto no grupo tratado com DMH como no respectivo grupo controle. Os resultados deste estudo indicam o zinco não mostrou ação protetora na etapa de iniciação da carcinogênese do cólon induzida pela DMH em ratos Wistar machos.

Palavras-chave: quimioprevenção, zinco, carcinogênese do cólon, focos de criptas aberrantes.

Abstract

The present study was designed to investigate the possible chemopreventive action of zinc gluconate (ZnGly) on the initiation step of colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in male Wistar rats. The animals were divided into four groups and received three doses of DMH (40 mg/Kg, s.c) or EDTA (DMH vehicle) and 15 mg/Kg of zinc glycine (ZnGly) administered by gavage for four weeks. After the narcosis, blood and colon fragments samples were collected for zinc dosage. The entire colon was removed, fixed in buffered formalin 10%, stained with methylene blue for the analysis of ACF formation. The rates of cell proliferation and apoptosis were also analyzed in epithelial crypt cells. The exposure to DMH significantly increased the rates of cell proliferation and apoptosis in epithelial crypt cells. Treatment with zinc glycine (ZnGly) did not alter the number and multiplicity of ACFs, as well as apoptosis and cell proliferation indices in both DMH-treated and control group. The present findings indicate that zinc did not present chemopreventive effects on the initiation step of DMH-induced colon carcinogenesis in male Wistar rats.

Key Words: chemoprevention, zinc, colon carcinogenesis, aberrant crypt foci.

2. Introdução

O zinco é considerado um oligoelemento, pois apresenta-se em quantidades diminutas no organismo, o que representa apenas 0,003% (1,4 a 2,3g) do corpo humano (Tasman, 1992). Embora em quantidades tão reduzidas, o zinco é importante componente estabilizador de macromoléculas e membranas biológicas, sendo necessário em todas as fases da vida (Tasman, 1992). Algumas das principais fontes de zinco são: carnes bovinas e suínas, peixes, aves, leite e derivados, cereais e feijão (Taco, 2004).

Estudos sugerem que a quantidade de zinco presente na alimentação pode exercer efeitos benéficos para a saúde humana, como modulação do risco do câncer do cólon, em virtude de suas propriedades antioxidantes (Zilegler et al, 2003; Anetor et al., 2007). É provável que o zinco apresente papel na proteção contra neoplasias, e exerça função na inibição do crescimento e proliferação de diversos tipos de células tumorais, incluindo células do câncer do cólon (Park et al., 2002; Klein et al., 2006;). Este metal atua na sobrevivência e função das células, agindo como co-fator de diversas enzimas que participam da replicação celular, combatendo os radicais livres de oxigênio, e na manutenção da integridade do ácido dezoxirribonucleico, metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos (Aggett, 1983; Prasad, 2003). A redução dos níveis de zinco na alimentação constitui um dos fatores de risco no desenvolvimento e progressão de tumores do cólon e reto (Song et al., 1993).

Os minerais quelatados são definidos por Leeson and Summers (1997) como produto resultante da reação de um íon metálico com composto orgânico, como aminoácido, o qual funciona como carreador e possui a capacidade de se ligar ao metal por ligações covalentes através de grupamentos aminos ou oxigênio, formando uma estrutura cíclica, como na reação que ocorre com o zinco complexado à glicina (ZnGly).

Alguns autores sugerem que os minerais quelatados são melhor absorvidos pela célula epitelial do intestino do que os inorgânicos, como o sulfato de zinco (ZnSO₄) pois utilizam as

vias de absorção das moléculas orgânicas que a eles estão ligados (Kratzer and Vohra, 1996). O efeito de metais quelatados baseado em zinco foi avaliado em células de melanoma maligno de camundongos B16BL6, e foi observado indução de apoptose e redução do crescimento tumoral, sugerindo seu potencial como agente anti-neoplásico (Ferry et al, 1998). Todavia, os estudos com uso de minerais quelatados são limitados.

A pesquisa de câncer do cólon é de grande importância, pois essas neoplasias malignas apresentam um importante problema de saúde pública, por representarem uma das principais causas de morte por câncer no Brasil, e corresponderem a aproximadamente 70% das neoplasias malignas do trato gastrointestinal, com estimativa de 28.110 casos no ano de 2010 (INCA, 2010).

São adotados modelos experimentais que permitem observação detalhada das alterações que precedem o desenvolvimento da neoplasia maligna a nível macroscópico e histológico para melhor compreensão dos mecanismos iniciais envolvidos no câncer do cólon. (Mayer et al., 1987). Estudos indicam que lesões pré-neoplásicas, relatadas como focos de criptas aberrantes são importantes biomarcadores utilizados como ferramenta para entender a patogênese do câncer do cólon em estudos experimentais (Bird, 1987). Essas criptas são volumosas, irregulares e revestidas por epitélio displásico, que constitui uma característica chave do estado pré-neoplásico (Bird, 1987; McLellan and Bird, 1988).

Esses focos apresentam mudanças no padrão de atividade enzimática, como redução das taxas da hexosaminidase (Pretlow et al., 1993) e da produção de mucinas, com aumento de sialomucinas e perda de sulfomucinas, fenômeno geralmente associado ao grau de displasia e multiplicidade das criptas (Femia et al., 2004). Além disso, estudos demonstraram alterações genéticas nos FCAs, tais como mutações nos genes K-ras, APC e TP53, relacionadas à proliferação celular, presença de instabilidade de microssatélites, um marcador

de erros no sistema de reparo do DNA e alterações em genes associados à inflamação tais como o INOS e COX-2 (Nucci et al., 1997; Takahashi and Wakabayashi, 2004).

Não há estudos *in vitro* ou *in vivo* sobre o potencial quimioprotetor do zinco na forma de quelato de zinco (ZnGly) em modelos experimentais da carcinogênese do cólon. Assim é de extrema importância que sejam feitas investigações sobre os possíveis efeitos quimioprotetores do ZnGly no processo de carcinogênese do cólon.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar o possível efeito quimioprotetor do zinco na forma de quelato (ZnGly), administrado por via oral, na etapa de iniciação da carcinogênese do cólon, em modelo de carcinogênese induzido pela 1,2 dimethyllhidrazina (DMH) em ratos Wistar machos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar se o ZnGly administrado na dose de 15mg/Kg por via oral, modifica a formação de FCAs, os índices de proliferação celular, bem como os índices de apoptose induzidos pela DMH.

4. Material e métodos

4.1 Animais e ambiente de experimentação

Ratos machos Wistar (n= 20), com 28 dias de idade foram adquiridos no primeiro semestre de 2009 do Centro Multidisciplinar de investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Campinas – SP). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos no Biotério da Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão contínua do ar.

Os animais receberam ração comercial (Nuvilab CR1-Nuvital, PR, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram pesados semanalmente, e o consumo de ração e água avaliados três vezes por semana ao longo do experimento.

Após 14 dias de aclimação, os animais com 42 dias de idade receberam ZnGly (15mg/Kg) por gavagem, utilizando-se água filtrada como veículo, três vezes por semana, durante todo período experimental.

Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo colégio brasileiro de Experimentação animal (COBEA), e aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEAA) da Faculdade de Medicina de Botucatu, protocolo nº (731) (**Anexo**).

4.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em quatro grupos experimentais de 5 animais cada (**Figura 1**). Ao final da 4ª semana de experimento os animais foram submetidos à eutanásia.

Protocolo Experimental (Modulação da fase de Iniciação)

Grupo 1 (controle negativo): Os animais receberam ração comercial e água *ad libitum*, durante todo o experimento. A partir do décimo quarto dia foi aplicado 1ml de solução de EDTA (veículo da DMH) via subcutânea (sc), uma vez por semana, durante três semanas. Os animais foram eutanasiados no final da quarta semana de experimento.

Grupo 2: Os animais receberam ração comercial, água *ad libitum* e ZnGly (15mg/Kg) via oral (gavage) durante todo o experimento. A partir do décimo quarto dia foi aplicado solução de DMH na dose de 40mg/Kg, sc, uma vez por semana, durante três semanas. Os animais foram eutanasiados no final da quarta semana de experimento.

Grupo 3 (Controle Positivo): Os animais receberam ração comercial e água *ad libitum* durante todo o experimento. A partir do décimo quarto dia foi aplicada solução de DMH na dose de 40mg/Kg, sc, uma vez por semana, durante três semanas. Os animais foram eutanasiados no final da quarta semana de experimento.

Grupo 4: Os animais receberam ração comercial, água *ad libitum* e ZnGly (15mg/Kg) via oral (gavagem) durante todo o experimento. A partir do décimo quarto dia foi aplicado 1ml de solução de EDTA, sc, uma vez por semana, durante três semanas. Os animais foram eutanasiados no final da quarta semana de experimento.

4.3 Substâncias utilizadas

4.3.1 Solução de 1,2 dimetilhidrazina

A solução de 1,2 dimetilhidrazina (DMH, Sigma Chemical CO, Mo, EUA) foi diluída na dose de 40mg/Kg em EDTA (37 mg/100ml de água destilada) no momento da aplicação.

4.3.2 Quelato de zinco (ZnGly)

O ZnGly foi fornecido gentilmente pela Farmácia Cruz Vermelha de Botucatu - SP, na forma de solução e diluída em água filtrada na dose de 15mg/Kg no momento da aplicação.

4.4 Eutanásia, Coleta e Processamento do material, e Quantificação de FCA

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ ao final da quarta semana de tratamento experimental. Após a narcose foi coletada amostra de sangue (1ml) e, em seguida fragmento do cólon (aproximadamente 1 cm) de cada animal para dosagens de zinco.

À necropsia foi feita remoção de todo cólon e reto, inspeção para observação da presença de alterações macroscópicas e lavagem em solução de NaCl 0,9% para a retirada de resíduos fecais. Foi realizada a incisão da parede longitudinalmente na linha mesentérica no sentido cólon proximal/reto.

O cólon de cada animal foi estirado, acondicionado em pranchas de isopor e fixado em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas. Posteriormente, as peças foram lavadas em água por 12 horas e mantidos em álcool 70% até o momento da análise.

Para contagem de focos de criptas aberrantes, os cólons foram retirados do álcool 70%, lavados em água corrente e corados em solução de azul de metileno a 0,2% em PBS por aproximadamente 2 minutos (**ver Anexo 1**).

O cólon foi cortado nas porções distal, medial e proximal, e cada porção foi colocada sobre uma lâmina (**ver Anexo 2**). Os segmentos foram analisados em microscópio de luz convencional em objetiva de 40X (Axiostar plus, Zeiss). A identificação e quantificação dos FCAs foram baseadas em seus aspectos morfológicos diferenciais segundo Bird (1995), 1) tamanho aumentado e aspecto basófilo com hipercromasia da região epitelial (camada de células epiteliais mais espessa) em plano (mais elevado) diferente das criptas intestinais normais circunjacentes; 2) abertura das criptas de aspecto alterado (circular a alongada, elíptica ou tortuosa); 3) Criptas aberrantes isoladas ou em focos, designados como focos da cripta aberrantes que ocupam área maior que a ocupada por um número equivalente de criptas morfolologicamente normais. Não existem criptas de morfologia normal entre as criptas aberrantes dentro desses focos.

Foram quantificados os FCAs com 1, 2, 3, 4 ou mais criptas aberrantes (CAs), número total de CAs e número total de FCAs por segmento de cólon analisado, sendo padronizado o sentido de análise (cólon distal- cólon proximal).

O cólon proximal foi descartado, após contagem dos FCAs, pois não apresentou número de FCAs que justificasse seu processamento histológico.

As porções dos cólons foram cortadas longitudinalmente, fornecendo uma vista de criptas em disposição perpendicular, e colocados em cassetes plásticos, resultando em um total de seis fragmentos, três fragmentos do cólon distal e três do cólon medial (D1, D2, D3 e M1, M2, M3). Todos os fragmentos foram processados para obtenção de cortes histológicos, que foram corados pela hematoxilina-eosina (HE), e para reações de imunoistoquímica.

4.5 *Índice de proliferação celular*

A atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa do cólon foi estimada utilizando-se análise imunoistoquímica da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). As lâminas histológicas passaram pelos seguintes processos: desparafinização, bloqueio de peroxidases endógenas (20 minutos no peróxido de hidrogênio 3% em PBS), bloqueio de ligações inespecíficas (60 minutos no leite desnatado 1%), conjugação *over-night* com anticorpo primário específico diluído em BSA (1:100 monoclonal anti-PCNA, clone PC10, DakoCytomation); aplicação do polímero conjugado a peroxidase (pós-primário e anti-mouse/rabbit IgG – Poly HRP, Leica, por 30 minutos cada), revelação com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetracolorido (DAB, Sigma-Aldrich do Brasil, por 10 minutos), contra-coloração (Hematoxilina de Harris), desidratação e montagem.

Para análise de índices de proliferação celular foram examinadas 20 criptas perpendiculares na mucosa do cólon médio de cada animal, à microscopia óptica, com objetiva de 40x. Os índices de proliferação celular foram determinados pela porcentagem de células com núcleos marcados em marrom pelo PCNA em relação ao número total de células epiteliais analisadas. Os números de células epiteliais e o número de núcleos corados foram estimados em cada cripta, partindo-se da base em direção ao ápice da cripta (Ziliotto, 2008).

4.6 *Índice de Apoptose*

Os índices de apoptose foram quantificados, utilizando-se a coloração de cortes histológicos pela hematoxilina e eosina (HE). Para determinação de índices de apoptose, foi calculada a taxa de apoptose como a porcentagem de células em apoptose (células com núcleo condensado ou fragmentado, formando corpos apoptóticos) em relação ao número total de células epiteliais de cada cripta de acordo com Dias et al. (2006).

4.7 Dosagem quali-quantitativa de zinco

A dosagem de zinco no sangue total e no fragmento do cólon de cada animal foi realizada no Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), do Instituto de Biociências (IB) da UNESP de Botucatu. Inicialmente as amostras foram submetidas à metodologia de mineralização por micro-ondas (Provecto modelo - DGT 100 Plus), seguindo o manual da Provecto Analítica, 2000. A seguir, foi realizada análise quali-quantitativa do zinco utilizando-se espectrofotômetro de absorção atômica (GBC – modelo AA932), através das técnicas de espectrometria por absorção atômica e atomização por chama.

4.8 Análise Estatística.

A análise estatística dos parâmetros analisados foi realizada pelo programa software Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Os dados de peso corpóreo, o consumo de ração e água, índices de apoptose e de proliferação celular (PCNA), análise de criptas aberrantes (CA total, FCA total e FCA/CA) e níveis de zinco foram avaliados entre os diferentes grupos experimentais utilizando-se testes não paramétricos de ANOVA ou Kruskal-Wallis para amostras independentes. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1 Observações de biotério

Durante todo o período de tratamento com ZnGly, os animais mostraram-se clinicamente saudáveis e não foram registrados óbitos no decorrer do experimento.

5.2 Consumo de água e ração, e ganho peso corpóreo

A **Tabela 1** indica os valores de média e desvio-padrão do consumo estimado de ração basal (g/rato/dia), água (ml/rato/dia) e ganho de peso (g) dos animais nos diferentes grupos experimentais, no protocolo de curta duração (4 semanas).

Não houve diferenças significativas entre os grupos quanto ao consumo de ração e água, bem como a evolução do peso corpóreo.

5.3 Observação de necropsia

À necrópsia não foram encontradas lesões macroscópicas, com ausência de nodulações em todos os animais.

5.4 Análise quantitativa de focos de criptas aberrantes (FCA).

A **Tabela 2** indica os valores de média e desvio-padrão dos parâmetros de avaliação de FCAs no cólon dos animais dos grupos **G1, G2, G3 e G4**. Não foram encontradas criptas aberrantes nos animais dos grupos não tratados com o cancerígeno químico (**G1 e G4**). Nos grupos que receberam DMH (**G2 e G3**) foram notados FCAs, em sua maioria, constituídos por uma cripta e, no máximo, por três criptas.

O número total de CA, FCA e CA/FCA não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com o cancerígeno químico (**G2 e G3**).

5.5 Índices de proliferação celular e apoptose

Os índices de proliferação celular pelo PCNA na mucosa do cólon nos diferentes grupos experimentais são apresentados na **Tabela 3**. Os grupos tratados com DMH (**G2 e G3**) apresentaram aumento significativo da taxa de proliferação celular, quando comparados aos grupos não iniciados (**G1 e G4**) ($p \leq 0,001$) (**Figura 3**). O tratamento com ZnGly por via oral, não modificou as taxas de proliferação das células epiteliais da mucosa do cólon tanto no grupo iniciado (**G2**) como no grupo não iniciado (**G4**).

A **Tabela 4** indica os índices de apoptose na mucosa do cólon nos diferentes grupos experimentais. Os grupos tratados com DMH (**G2 e G3**) apresentaram aumento significativo de células em apoptose, quando comparados aos grupos não iniciados (**G1 e G4**) ($p \leq 0,01$). A **Figura 4** mostra célula em apoptose. O tratamento com ZnGly por via oral, não alterou os valores de corpos apoptóticos das células epiteliais da mucosa do cólon tanto no grupo iniciado (**G2**) como no grupo não iniciado (**G4**).

5.6 Dosagem quali-quantitativa de zinco no cólon e no sangue.

A **Figura 5** indica os níveis de zinco dosados no cólon dos animais, apresentados por valores médios e desvio padrão nos diferentes grupos experimentais.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos que foram expostos ou não ao ZnGly (**G1, G2 e G4**), quanto aos níveis de zinco dosados na mucosa do cólon dos animais.

A **Figura 5** indica os níveis de zinco dosados no sangue dos animais, apresentados por valores médios e desvio padrão nos diferentes grupos experimentais. Os valores para nível de zinco no sangue apresentaram significativamente maiores nos grupos que receberam ZnGly (**G2 e G4**), quando comparados ao o grupo controle (**G1**) e ao grupo que recebeu apenas

DMH (**G3**) ($p \leq 0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos expostos ao ZnGly (**G2** e **G4**).

6. Discussão

Tem sido proposto que o número total, a distribuição e a multiplicidade dos FCAs correlacionam-se com a incidência de tumores do cólon (Bird, 1987; Mc Lellan and Bird, 1988), e que FCA é importante ferramenta nos estudos de agentes quimioprotetores ou quimiopreventivos do desenvolvimento neoplásico, induzido por cancerígenos químicos (Stevens, 2007).

Nossos resultados demonstram que o zinco e/ou o uso do cancerígeno químico no protocolo de curta duração da carcinogênese do cólon, não interferiu na ingestão de alimentos e de água, bem como no ganho de peso corpóreo dos animais, o que mostra que os animais toleraram essas substâncias no organismo, de forma que não houve alterações fisiológicas.

Não foram encontradas criptas aberrantes nos animais dos grupos não tratados com o cancerígeno químico, o que indica que o zinco na dose de 15mg/Kg administrado por via oral (gavagem) não exerce ação iniciadora da carcinogênese do cólon. Esses resultados se somam a estudos *in vitro* de genotoxicidade, realizados com células de mamíferos, demonstrando que o zinco não é carcinogênico, mutagênico ou teratogênico (Vilkina et al., 1978; Kasprzak et al., 1988).

A dose de 15mg/Kg de ZnGly administrada foi igual a recomendada (15mg/dia) para um indivíduo de 70Kg (Tapiero and Tew, 2003). Assim, mesmo em doses similares a recomenda para humanos, o zinco não foi capaz de exercer efeito protetor na etapa de iniciação da carcinogênese do cólon induzida pela DMH no rato.

Nos animais tratados com a DMH, o ZnGly não alterou significativamente o número de FCA, CA e CA/FCA. Esses resultados indicam que o ZnGly na dose de 15mg/Kg não inibiu o processo de iniciação da carcinogênese do cólon, o que pode estar atribuído à baixa absorção deste elemento pela mucosa do cólon dos animais (Valle and Falchuke, 1993), evidenciada pela semelhança entre os valores médios de nível de zinco no cólon dos animais expostos ou não ao ZnGly (**G1**, **G2** e **G4**). Estudos sugerem que os minerais quelatados são melhor absorvidos pela célula epitelial do intestino do que os inorgânicos, pois utilizam as vias de absorção das moléculas orgânicas que a eles estão ligados. Portanto o mecanismo pelo qual o agente quelante melhora a biodisponibilidade do mineral, depende da capacidade do ligante seqüestrá-lo, ou de sua habilidade em competir com outros ligantes no trato digestivo, formando complexos solúveis com o mineral, de forma que seja melhor absorvido pela mucosa intestinal (Kratzer and Vohra, 1996). Assim o ZnGly pode ter apresentado uma baixa biodisponibilidade, devido ao rompimento da ligação Zn-Gly por outras substâncias do trato digestivo que compete com a glicina e se liga ao zinco, formando complexos estáveis insolúveis, o que dificulta a absorção deste metal na mucosa intestinal. Desta forma, o tratamento com ZnGly não pode atuar na proteção do processo de iniciação da carcinogênese do cólon.

Em relação aos níveis de zinco no sangue, os grupos **G2** (exposição ao ZnGly e DMH) e **G4** (exposição ao ZnGly), apresentaram valores significativamente maiores, quando comparados aos grupos **G1** (controle), e **G3** (exposição a DMH), o que deve ser atribuído à exposição dos animais dos grupos **G2** e **G4** ao ZnGly.

Esses resultados indicam que o zinco apresentou uma baixa absorção pela mucosa do cólon dos animais (Valle and Falchuke, 1993) e que este elemento pode estar sendo absorvido em grande proporção pelo intestino delgado, desta forma foi observado maior nível de zinco

no sangue dos animais que receberam ZnGly quando comparado aos animais não expostos a este metal.

Em nosso estudo piloto, foi demonstrado alto nível de zinco nas fezes dos animais que receberam ZnGly (227mg/l) na água de beber em relação aos animais que não foram expostos a este mineral. Esta dose foi escolhida com base em relatos anteriores de efeitos benéficos do zinco em outros modelos experimentais (Dani et al., 2007). Os níveis de zinco no cólon não diferiram entre os animais que receberam ou não ZnGly, sendo que no sangue o nível de zinco apresentou-se bem elevado nos animais que foram expostos ao ZnGly quando comparado aos animais que não receberam este elemento (**ver Anexo 5**). Esses resultados referendam os encontrados pelo presente estudo.

Embora o mecanismo de absorção intestinal de zinco tenha sido parcialmente elucidado, ainda não é completamente entendido, mas há trabalhos na literatura que mostram que a absorção de zinco depende do tempo, concentração, pH, e temperatura (Reyes, 1996).

Estudo *in vitro* com células HCT-116 de câncer do cólon, após tratamento com cloreto de zinco (ZnCl_2), demonstrou inibição da proliferação destas células, que carregam mutação no gene APC, através da estabilização da proteína APC, o que induziu parada do ciclo celular na fase G2/M (Jaiswal & Narayan, 2004).

O aumento da proliferação celular é condição importante na carcinogênese humana e experimental (Chang et al., 1997). A proliferação celular epitelial na mucosa do cólon pode ser afetada por substâncias inibidoras, e assim reduzir a chance de expressão do tumor e desenvolvimento da carcinogênese do cólon (Difronzo et al., 1987). Os resultados para proliferação celular obtidos neste estudo, demonstraram que a exposição à DMH aumentou significativamente a proliferação celular na mucosa do cólon, como observado pelo aumento dos índices de marcação pelo PCNA nas células epiteliais expostas ao cancerígeno químico. A administração do ZnGly na dose de 15mg/Kg não modificou as taxas de proliferação

celular da mucosa do cólon, tanto no grupo tratado com DMH, como no respectivo grupo controle não iniciado. Portanto nossos resultados demonstram que o tratamento com o ZnGly (15mg/kg) por gavagem não interferiu na atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa do cólon.

Em relação ao índice de apoptose, os resultados do presente estudo demonstraram aumento significativo nas células epiteliais expostas ao cancerígeno químico. A administração do ZnGly na dose de 15mg/Kg não modificou as taxas de apoptose da mucosa do cólon, tanto no grupo tratado com DMH como no respectivo grupo controle não iniciado, embora alguns autores tenham atribuído o papel antitumoral do zinco como ativador da transcrição do gene p53, supressor tumoral, que induz o processo de apoptose (Cho et al., 1994). Segundo os autores, o zinco é responsável pela conformação funcional da proteína p53, desempenhando papel crítico na sua estrutura, o qual apresenta um átomo de zinco fortemente ligado que é necessário para a ligação do p53 ao DNA.

7. Conclusões

O ZnGly administrado por gavagem, na dose de 15mg/Kg, não alterou o desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCAs) e não interferiu sobre a atividade proliferativa e taxa de apoptose da mucosa do cólon, tanto no grupo exposto ao cancerígeno químico, como no respectivo grupo controle. Portanto o ZnGly administrado por gavagem, na dose de 15mg/Kg, não mostrou ação protetora da etapa de iniciação da carcinogênese do cólon induzida pela DMH em ratos Wistar machos.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela CNPq (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

8. Referências bibliográficas

- Aggett, P.J., 1983. Acrodermatitis enteropathica. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1, 39-43.
- Anetor, J.L., Wanibuchi, H., Fukushima, S., 2007. Arsenic exposure and its health effects and risk of cancer in developing countries: micronutrients as host defence. *Asian Pacific J. Cancer.* 8, 13-23.
- Bird, R.P., 1987. Observation and qualification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 37, 147-151.
- Chang, W.L., Chapkin, R.S., Lupton, J.R., 1997. Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate marks for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 18, 721-730.
- Cho, Y., Gorina, S., Jafferey, P.D., Pavletich, N.P., 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science.* 265, 346-355.
- Dani, V., Goel, A., Vaiphei, K., Dhawan, D.K., 2007. Chemopreventive potential of zinc in experimentally induced colon carcinogenesis. *Toxicol lett.* 171, 10-18.
- Dias, M.C., Spinardi-Barbisan-, A.L.T.S., Rodrigues, M.A.M., Camargo, J.L.V., Terán, E., Barbisan L.F., 2006. Lack the chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *F. Chem Toxicol.* 44, 877-884.
- Difronzo, G., Capelletti, V., Miodini, P., Bertario, G., 1987. role of celular retionic acid binding proteína in patients with large bowel cancer. *Cancer Detect. Prev.* 10, 352-337.

- Femia, A.P., Dolara, P., Caderni, G., 2004. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoximethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 25, 277-281.
- Ferry, G., Boutin, J.A., Hennig, P., Genton, A., Desmet, C., Fauchère, J.L., 1998. A zinc chelator inhibiting gelatinases exerts potent in vitro anti-invasive effects. *Eur. J. Pharmacol.* 351, 225-233.
- Instituto Nacional do Câncer., 2010. Estimativa de 2010: Incidência de Câncer no Brasil. INCA, Rio de Janeiro.
- Jaiswal, A.S., Narayan, S., 2004. Zinc stabilizes adenomatous polyposis coli (APC) protein levels and induces cell cycle arrest in colon cancer. *J. Cell Biochem.* 93, 345-357.
- Kasprzak, K.S., Kovatch, R.M., Poirier, L.A., 1988. Inhibitory effect of zinc on nickel subsulfide carcinogenesis in Fisher rats. *Toxicology*. 52, 253–262.
- Klein, C., Creach, K., Irintcheva, V., Hughes, KJ., Blackwell, PL., Corbett, JA., Baldassare, J.J., 2006. Zinc induces ERK-dependent cell death through a specific Ras isoform. *Apoptosis*. 11, 1933-1944.
- Kratzer, F.H., Vohra, P., 1996. Chelates and chelation. in: Kratzer, F.H., Vohra, P. Chelates in nutrition. CRC Press, Boca Raton, pp. 5-33.
- Leeson, S., Summers, J.D., 1997. Commercial poultry nutrition, second. Guelph, University Books, pp. 57-58.
- Mayer, D., Trocheris, V., Hacker, HJ., Villard, V., Murat, J.C., Bannasch, P., 1987. Sequential Histochemical and morphometric studies on preneoplastic and neoplastic lesions induced in rat colon by 1,2 dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*. 8, 155-161.

- McLellan, E.A., Bird, R.P., 1988. Specificity study to evaluate induction of aberrant crypts in murino colons. *Cancer Res.* 48, 6183-6186.
- Nucci, M.R., Robinson, C.R., Longo, P., Campbell, P., Hamilton, S.R., Nucci, M.R., 1997. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci human colorectal mucosa. *Hum Pathol.* 28, 1396-1407.
- Park, K.S., Ahn, Y., Kim, J.A., Yun, M.S., Seong, B.L., Choi, K.Y., 2002. Extracellular zinc stimulates ERK-dependent activation of p21 Cip/WAF1 and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. *Br. J. Pharmacol.* 137, 597-607.
- Prasad, A.S., 2003. Zinc deficiency. *BMJ.* 326, 409-410.
- Pretlow, T.P., O'Riordan, M.A., Spancake, K.M., Pretlow, T.G., 1993. Two types of putative preneoplastic lesions identified by hexamedinidase activity in whole-mounts of colons from F344 rats treated with carcinogen. *Am. J. Pathol.* 142, 1695-1700.
- Reyes, J.G., 1996. Zinc transport in mammalian cells. *Am. J. Physiol.* 270, 401-410.
- Stevens, R.G., Swede, H., Heinen, C., Jablonski, M., Grupka, M., Ross, B., Parente, M., Tirnauer, J.S., Giardina, C., Raian, T.V., Rosenberg, D.W., Levine, J., 2007. Aberrant crypt foci in patients with a positive family history of sporadic colorectal cancer. *Cancer Lett.* 248, 262-268.
- Song, M.K., Heng, M.C., Rolandelli, R., Ament, M.E., Heng, M.K., 1993. Possible link between zinc intake and colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 667-669.
- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)., 2004. Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação (NEPA). Universidade de Campinas, UNICAMP. Disponível em URL: [http:// www.unicamp.br/nepa/taco](http://www.unicamp.br/nepa/taco).

- Takahashi, M., Wakabayashi, K., 2004. Gene mutations and altered gene expression in azoximethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.* 95, 475-480.
- Tapieiro, H., Tew, K.D., 2003. Trace elements un human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Phamacother.* 57, 399-311.
- Tasman – Jones, C., 1992. Distúrbios no metabolismo de oligoelementos, in: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennet JC. *Tratado de Medicina Interna*. Nineth ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Cap.1, pp.1204-1207.
- Valle, B.L., Falchuk, K.H., 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 73, 79-118.
- Vilkina, G.A., Pomerantzeva, M.D., Ramaya, L.K., 1978. Lack of mutagenic activity of cadmium and zinc salts in somatic and germ mouse cells. *Genética.* 14, 2212–2214.
- Ziegler, T.R., Evans, M.E., Fernández-estívaris, C., Jones, D.P., 2003. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 229-261.
- Ziliotto, L., 2008. Modulação da carcinogênese do cólon pelo cogumelo *Agaricus blazei* no rato. [tese].Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

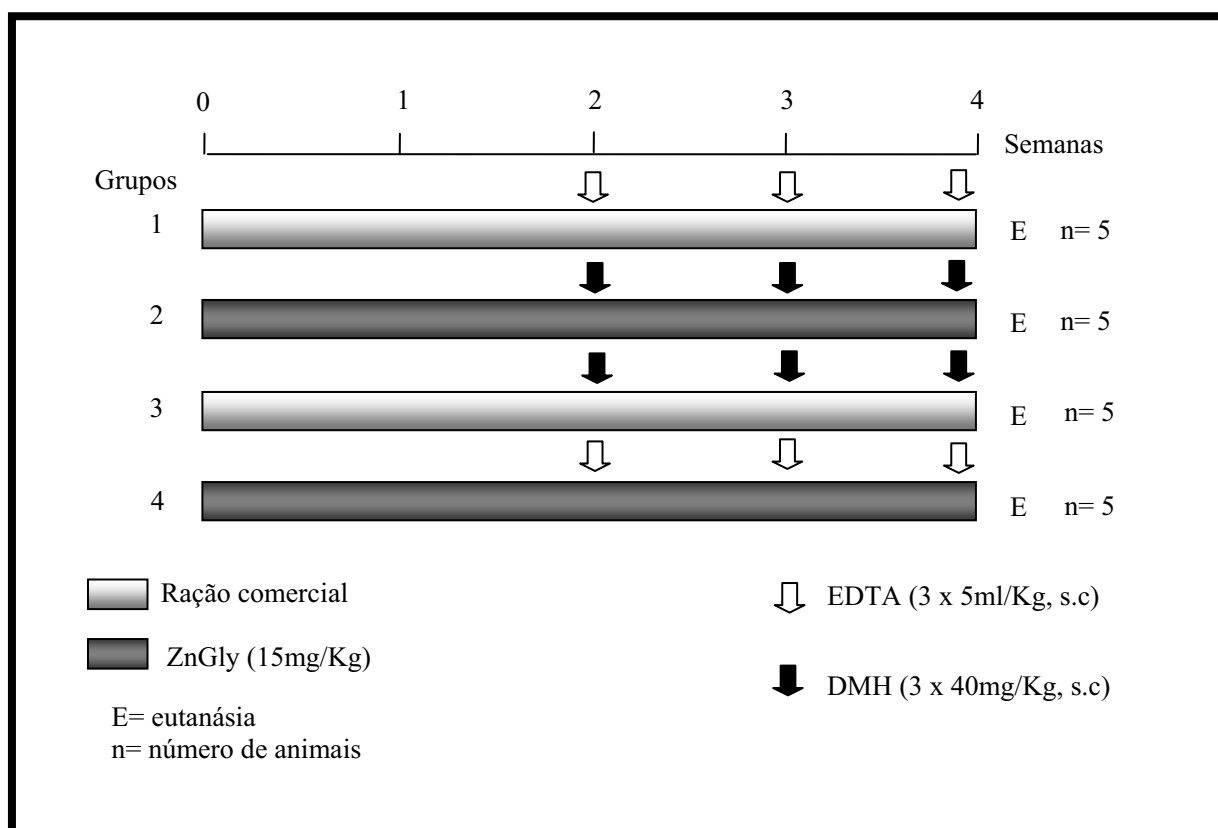


Figura 1 – Protocolo experimental quelato de zinco (ZnGly).

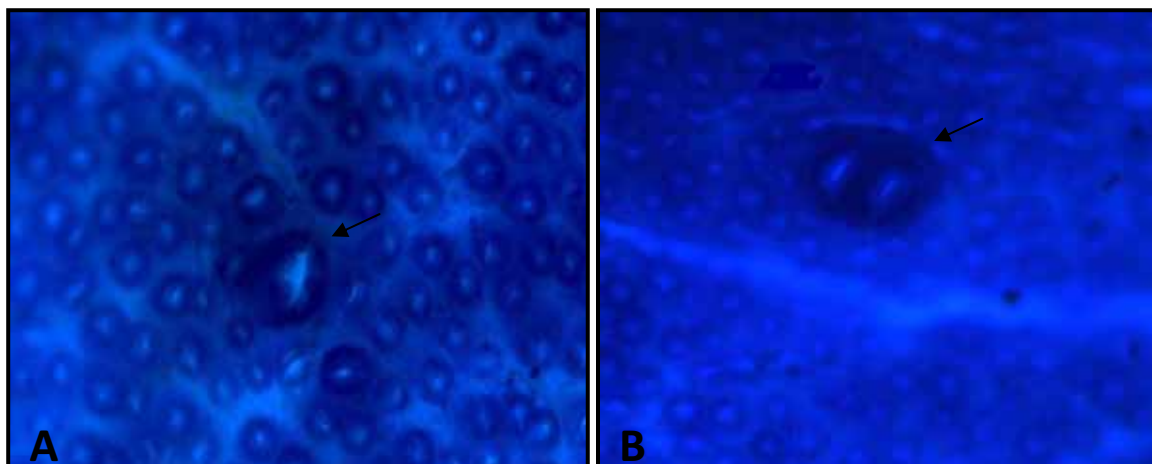


Figura 2 - Focos de criptas aberrantes (FCA) identificados pela coloração de azul de metileno: A) FCA com uma cripta aberrante; B) FCA com duas criptas aberrantes. Objetiva de 20x.

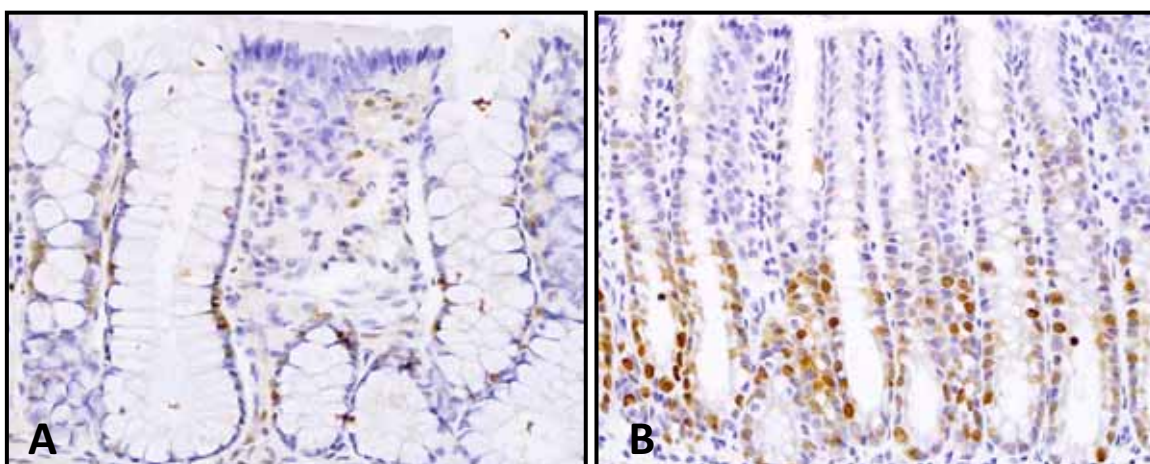


Figura 3 - Cortes histológicos de criptas intestinais de animal não iniciado pela DMH (A, objetiva de 40x) e iniciado (B, objetiva de 20x), mostrando expressão imunoistoquímica do PCNA (núcleos marrons) localizada principalmente na região basal das criptas (A vs B).

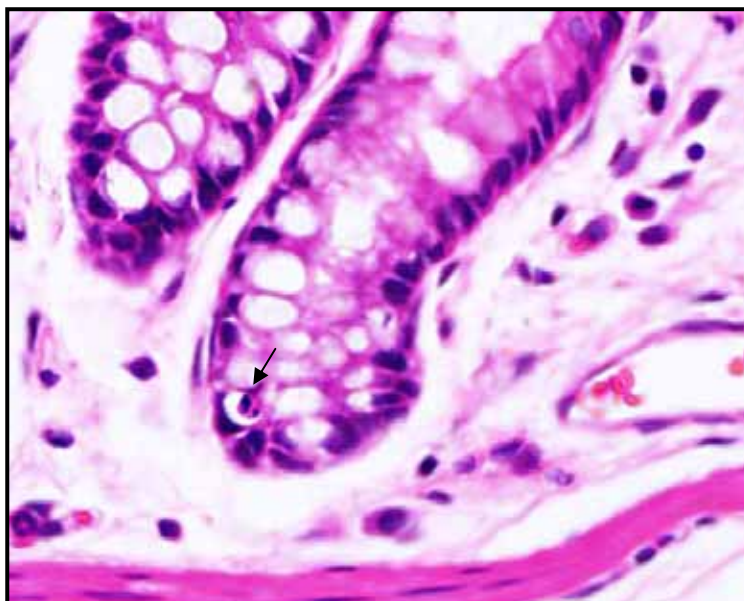


Figura 4 - Corte histológico de criptas intestinais de animal iniciado pela DMH mostrando corpo apoptótico (seta) objetiva de 40x.

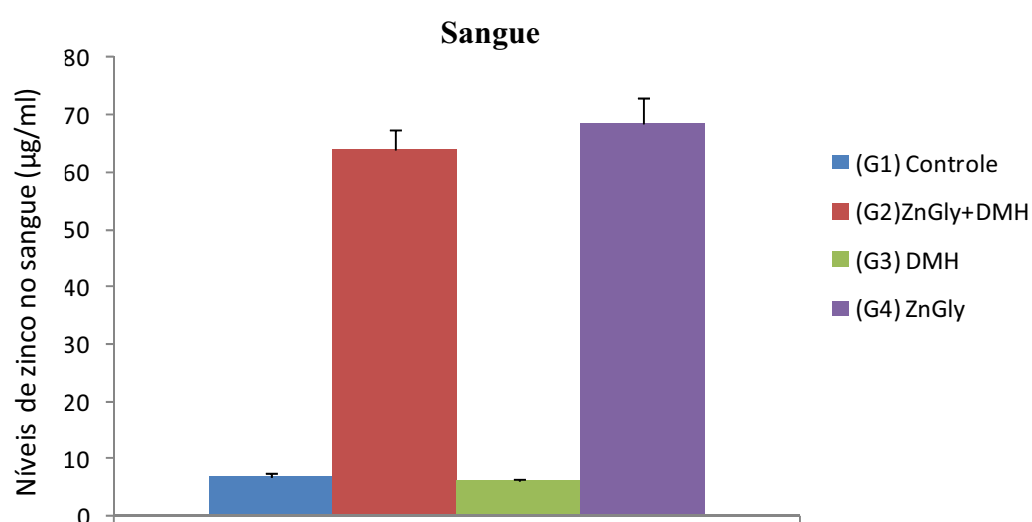
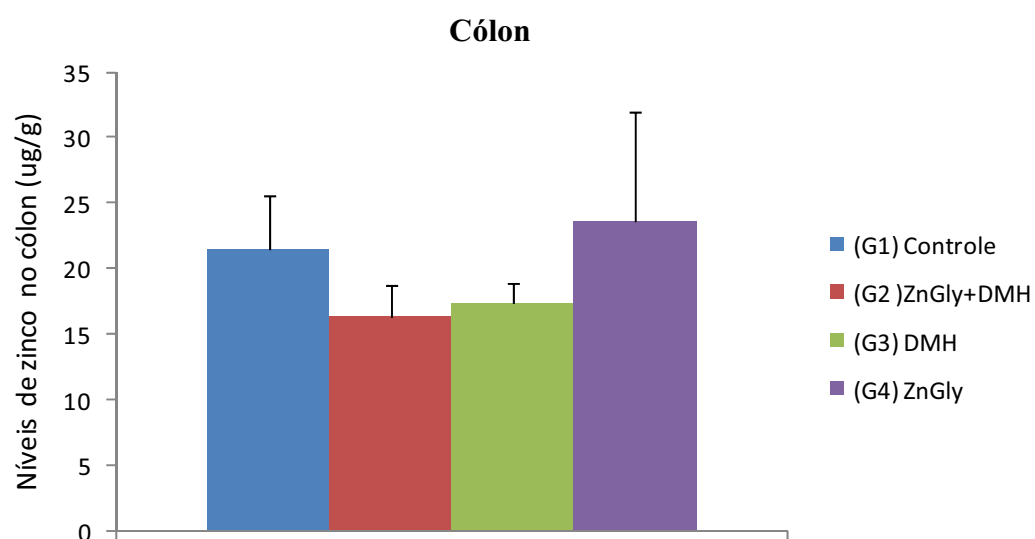


Figura 5 – Níveis de zinco no cólon ($\mu\text{g/g}$) e sangue ($\mu\text{g/ml}$) dos animais nos diferentes grupos experimentais ao final das 4 semanas de experimento.

Tabela 1. Consumo estimado de ração e água e ganho de peso durante as 4 semanas de experimento.¹

Grupo/Tratamento²	N	Consumo de ração (g/rato/dia)	Consumo de água (ml/rato/dia)	Ganho de peso (g)
(G1) Controle	5	26,68 ± 1,32	38,53 ± 9,69	136,40 ± 13,86
(G2) DMH + ZnGly	5	26,03 ± 2,23	37,22 ± 3,82	123,40 ± 14,57
(G3) DMH	5	26,32 ± 2,26	33,59 ± 4,19	121,60 ± 18,60
(G4) ZnGly	5	28,28 ± 4,32	36,95 ± 2,67	135,40 ± 9,37

¹Valores representados por média ± SD; ²DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/Kg p.c, s.c), ZnGly = Quelato de zinco (15 mg/Kg i.g), N = número de animais.

Tabela 2. Efeitos da exposição ao quelato de zinco (ZnGly) sobre o número e multiplicidade dos focos de criptas aberrantes (FCAs) durante as 4 semanas de experimento.¹

Grupos/Tratamentos ²	N	CA Total	FCA Total	1 FCA	2 FCA	3 FCA	>4 FCA	CA/FCA
(G1) Controle	5	0	0	0	0	0	0	0
(G2) DMH+ZnGly	5	21,16 ± 15,07	19,50 ± 12,20	18,16 ± 11,95	1,00 ± 1,26	0,33 ± 0,51	0	1,06 ± 0,06
(G3) DMH	5	18,20 ± 7,49	15,60 ± 6,50	13,20 ± 5,89	2,20 ± 1,30	0,20 ± 0,44	0	1,10 ± 0,10
(G4) ZnGly	5	0	0	0	0	0	0	0

¹Valores representados por média ± SD; ²DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/Kg p.c, s.c), ZnGly = Quelato de zinco (15 mg/Kg i.g), N = número de animais; CA = Cripta Aberrante, FCA = Foco de Cripta Aberrante.

Tabela 3. Índice de marcação pelo PCNA nas células epiteliais do cólon nos diferentes grupos experimentais¹.

Grupos/Tratamentos ²	N	Número de células/Cripta	Células PCNA ⁺ (%)
(G1) Controle	5	36,51 ± 1,69	14,04 ± 1,27 ^a
(G2) DMH+ZnGly	5	35,79 ± 1,36	26,31 ± 4,73 ^b
(G3) DMH	5	36,90 ± 1,06	25,49 ± 3,54 ^b
(G4) ZnGly	5	34,24 ± 1,34	13,10 ± 1,72 ^a

¹Valores representados por média ± SD; ²DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/Kg p.c, s.c), ZnGly = Quelato de zinco (15 mg/Kg i.g), N = número de animais. ^{a,b}Diferença significativa entre as médias dos grupos (G2 = G3 > G1 = G4, p ≤ 0,001).

Tabela 4. Índice de apoptose nas células epiteliais do cólon nos diferentes grupos experimentais¹.

Grupos/Tratamentos ²	N	Número de células/Cripta	Células em apoptose (%)
(G1) Controle	5	35,41 ± 1,85	0,02 ± 0,06 ^a
(G2) DMH+ZnGly	5	36,46 ± 1,97	2,18 ± 1,01 ^b
(G3) DMH	5	36,48 ± 1,32	1,78 ± 0,45 ^b
(G4) ZnGly	5	36,20 ± 1,11	0,03 ± 0,08 ^a

¹Valores representados por média ± SD; ²DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/Kg p.c, s.c), ZnGly = Quelato de zinco (15 mg/Kg i.g), N = número de animais. ^{a,b}Diferença significativa entre as médias dos grupos (G2 = G3 > G1 = G4, p ≤ 0,01).

V. Artigo 2 *

De acordo com as normas da revista **Toxicology Letters** .

Investigação do possível efeito quimioprotetor do sulfato de zinco (ZnSO₄), administrado por via oral ou intraperitoneal na etapa de iniciação da carcinogênese do cólon induzida pela 1,2-Dimetilhidrazina no rato.

Flávia R. Moraes da Silva ^a, Maria A. Marchesan Rodrigues ^a, Luis F. Barbisan ^{b, *}

^a Universidade Estadual Paulista-UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Patologia, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil

^b Universidade Estadual Paulista-UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Morfologia, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil

**Endereço para correspondência:*

Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, Ph.D.

Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, 18618-970, SP, Brasil.

Telefone/Fax: +55 14 3811 6238 ramal 236.

E-mail: mariam@fmb.unesp.br

Revista sugerida: **Toxicology Letters**, ISSN: 0378-4274

1. Resumo

O presente estudo foi delineado para investigar a participação do sulfato de zinco (ZnSO_4), na etapa de iniciação da carcinogênese do cólon, induzida pela 1,2- dimetilhidrazina (DMH) em ratos Wistar machos. Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais, receberam três doses de 40mg/Kg, via subcutânea (sc) de dimetilhidrazina (DMH) ou EDTA (veículo da DMH) e 60mg/Kg de sulfato de zinco (ZnSO_4) por via intraperitoneal (i.p) ou via oral (v.o) durante quatro semanas. Foram coletadas amostras de fezes em diferentes horários (8,16 e 24 horas) após aplicação do ZnSO_4 para dosagens de zinco. Após a narcose foram coletadas amostras de sangue e, em seguida fragmentos do cólon para dosagens de zinco. O cólon foi removido inteiro, fixado em formalina e corados com azul de metino para análise de incidência de focos de criptas aberrantes (FCAs), e processados para análise dos índices de apoptose e proliferação celular. O tratamento com sulfato de zinco (ZnSO_4) pela via intraperitoneal na dose de 60 mg/Kg mostrou ter efeitos de toxicidade de forma que reduziu significativamente o consumo de água e ração, e o peso corpóreo dos animais, sendo que sete animais evoluíram para óbito. O sulfato de zinco (ZnSO_4) administrado tanto pela via intraperitoneal, bem como pela via oral não alterou o número e multiplicidade de FCAs, assim como índices de apoptose e proliferação celular da mucosa do cólon. Os resultados indicam que nas condições experimentais empregadas nesse estudo, o sulfato de zinco (ZnSO_4) não apresentou efeitos quimioprotetores na etapa de iniciação da carcinogênese experimental do cólon, induzida quimicamente por dimetilhidrazina (DMH) em ratos Wistar machos, e que a via intraperitoneal não é adequada para modelo experimental de tratamento com o sulfato de zinco (ZnSO_4).

Palavras-chave: quimioprevenção, zinco, carcinogênese do cólon, focos de criptas aberrantes.

Abstract

The present study was designed to investigate the potential chemopreventive activity of zinc on the initiation step of colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in male Wistar rats. The animals were divided into six groups and received three doses of DMH (40 mg/Kg, s.c) or EDTA (DMH vehicle) and 60 mg/Kg of zinc sulfate (ZnSO_4) administered by intraperitoneal (i.p) or oral (o.r) routes for four weeks. Faeces samples were collected in different hours (8, 16 e 24 hours) after application of zinc. After the euthanasia, blood and colon fragments samples were collected for zinc dosage. The entire colon was removed, fixed in formalin, stained with methylene blue for the analysis of ACF formation. The rates of cell proliferation and apoptosis were also analyzed in epithelial crypt cells. Treatment with 60 mg/Kg from zinc sulfate (ZnSO_4) by intraperitoneal (i.p) route showed toxic effects leading significantly reduced food intake and water consumption, and body weight gain of animals, leading seven animals to death. Zinc sulfate (ZnSO_4) administered both intraperitoneally or orally did not alter the number and multiplicity of ACFs, as well as indices of apoptosis and cell proliferation of colonic mucosa in both DMH-treated and control group. The present findings indicate that zinc did not present chemopreventive effects on the initiation step of DMH-induced colon carcinogenesis in male Wistar rats. Furthermore, our data suggest that intraperitoneal route is not adequate for treatment with ZnSO_4 .

Key Words: chemoprevention, zinc, colon carcinogenesis, aberrant crypt foci.

2. Introdução

Durante todo o século XX e início do XXI o papel do zinco tem sido amplamente estudado (Botti, 2001). Em 1877, foi descrito a presença de zinco em músculo e fígados humanos, em seguida este elemento foi descrito em plantas e animais marinhos, e constatou-se que era um dos elementos mais importantes do organismo e essencial ao lactente, adulto e idoso (Shuttleworth, 1986). Em 1939, a demonstração da participação do zinco na enzima anidrase carbônica provou que esse era um elemento fundamental a todas as espécies (Shuttleworth, 1986). Vários estudos se seguiram demonstrando a importância da suplementação do zinco na alimentação (Sandstead, 1999)

O zinco é considerado um oligoelemento, pois se apresenta em quantidades diminutas no organismo, o que representa apenas 0,003% (1,4 a 2,3g) do corpo humano (Tasman, 1992). Embora em quantidades tão reduzidas, o zinco é importante componente estabilizador de macromoléculas e membranas biológicas, sendo necessário em todas as fases da vida (Tasman, 1992). Algumas das principais fontes de zinco são: carnes bovinas e suínas, peixes, aves, leite e derivados, cereais e feijão (Taco, 2004).

Estudos sugerem que a quantidade de zinco presente na alimentação pode exercer efeitos benéficos para a saúde humana, como modulação do risco do câncer do cólon, em virtude de suas propriedades antioxidantes (Zilegler et al, 2003; Anetor et al., 2007). É provável que o zinco apresente papel na proteção contra neoplasias, e exerça função na inibição do crescimento e proliferação de diversos tipos de células tumorais, incluindo células do câncer do cólon (Klein et al., 2006). Este metal atua na sobrevivência e função das células, de forma que age como co-fator de diversas enzimas que participam da replicação celular, combate aos radicais livres de oxigênio, manutenção da integridade do ácido dezoxirribonucleico, metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos (Prasad, 2003).

O câncer do cólon e reto é um dos principais responsáveis pelas mortes por neoplasias malignas, principalmente em países do ocidente (Parkin, 2001). No Brasil, o câncer de cólon figura entre as cinco primeiras causas de morte por câncer, e a distribuição percentual de tumores malignos de cólon e reto aproxima-se dos registros encontrados em países industrializados (INCA, 2001), tendo-se observado aumento significativo de suas taxas de incidência ao longo das últimas décadas, principalmente nas regiões sul e sudeste (INCA, 2001).

A pesquisa de câncer do cólon é de grande importância, pois essas neoplasias malignas apresentam um importante problema de saúde pública, por representarem uma das principais causas de morte por câncer no Brasil, e corresponderem a aproximadamente 70% das neoplasias malignas do trato gastrointestinal, com estimativa de 28.110 casos no ano de 2010 (INCA, 2010).

Para uma melhor compreensão dos mecanismos iniciais envolvidos no câncer do cólon, são adotados modelos experimentais que permite uma observação detalhada das alterações que precedem o desenvolvimento da neoplasia maligna a nível macroscópico e histológico (Mayer et al., 1987). A 1,2 dimetilhidrazina (DMH) e seus metabolitos são cancerígenos completos com alto grau de especificidade para o cólon, em varias espécies de roedores (Rogers and Nauss, 1985). A ação genotóxica desse cancerígeno induz FCAs na mucosa do cólon de roedores. Os FCAs são importantes biomarcadores, utilizados como ferramentas para entender a patogênese do câncer do cólon (Bird, 1995).

Estudos demonstraram alterações genéticas nos FCAs, tais como mutações nos genes K-ras, APC e TP53, relacionadas à proliferação celular, presença de instabilidade de microsatélites, um marcador de erros no sistema de reparo do DNA e alterações em genes associados à inflamação tais como o INOS e COX-2 (Takahashi and Wakabayashi, 2004).

Finley et al., (1995) sugerem que o zinco na forma de sulfato (ZnSO_4) é adequado para estudar os possíveis efeitos quimioprotetores do zinco nos processos de carcinogênese do cólon, pois relatam que o zinco iônico livre é capaz de difundir-se através da célula, enquanto o zinco complexado não. Dani et al. (2007) demonstraram um efeito positivo do potencial quimioprotetor do zinco ZnSO_4 em modelos experimentais.

Assim é de extrema importância que sejam feitas investigações sobre os possíveis efeitos quimioprotetores do ZnSO_4 no processo de carcinogênese do cólon.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar o possível efeito quimioprotetor do zinco na forma de sulfato (ZnSO_4), administrado por via intraperitoneal e oral, na etapa de iniciação da carcinogênese do cólon, em modelo de carcinogênese induzido pela 1,2 dimethillhidrazina (DMH) em ratos Wistar machos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar se o ZnSO_4 administrado na dose de 60mg/Kg tanto por via intraperitoneal, como por via oral, modifica a formação de FCAs, os índices de proliferação celular, bem como os índices de apoptose induzidos pela DMH.

4 Material e métodos

4.1 Animais e ambiente de experimentação

Ratos machos Wistar (n= 45), com 28 dias de idade foram adquiridos no primeiro semestre de 2009 do Centro Multidisciplinar de investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Campinas – SP). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos no Biotério da Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão contínua do ar.

Os animais receberam ração comercial (Nuvilab CR1-Nuvital, PR, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram pesados semanalmente, e o consumo de ração e água avaliados três vezes por semana ao longo do experimento.

Após 14 dias de aclimação, os animais com 42 dias de idade receberam ZnSO_4 (60mg/Kg), em duas doses de 30mg/Kg (uma de manhã e uma a tarde) três vezes por semana, utilizando-se a via intraperitoneal e a via oral (gavagem) durante todo período experimental.

Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da faculdade de Medicina de Botucatu, protocolo (nº 731) (**Anexo**).

4.2 Coleta de fezes

Foram coletadas amostras de fezes das caixas dos animais nos diferentes grupos experimentais para dosagens de zinco. As coletas foram realizadas (8, 16 e 24 horas) após cada aplicação de ZnSO_4 para análise da cinética deste metal no trato gastrointestinal.

4.3 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em seis grupos experimentais de 5 a 10 animais cada (**Figura 1**). Ao final da quarta semana de experimento todos os animais foram eutanasiados.

Protocolo Experimental (Modulação da fase de Iniciação)

Grupo 1 (Controle Negativo): Os animais receberam ração comercial e água *ad libitum*, durante todo o experimento. A partir do décimo quarto dia foi aplicado 1ml de solução de EDTA (veículo da DMH), via subcutânea (sc), uma vez por semana, durante três semanas.

Grupo 2 (Teste Via Intraperitoneal): Os animais receberam ração comercial, água *ad libitum*, e ZnSO₄ (60mg/Kg), em duas doses de 30mg/ Kg por dia por via intraperitoneal, durante todo o experimento. A partir do décimo quarto dia foi aplicada solução de DMH na dose de 40mg/Kg, sc, uma vez por semana, durante três semanas.

Grupo 3 (Controle Via Intraperitoneal): Os animais receberam ração comercial, água *ad libitum*, e ZnSO₄ (60mg/Kg), em duas doses de 30mg/ Kg por dia, por via intraperitoneal, durante todo o experimento. A partir do décimo quarto dia foi aplicado 1ml de solução de EDTA, via subcutânea, sc, uma vez por semana, durante três semanas.

Grupo 4 (Teste Via Oral): Os animais receberam ração comercial, água *ad libitum* e ZnSO₄ (60mg/Kg), em duas doses de 30mg/Kg por dia por via oral (gavagem), durante todo o experimento. A partir do décimo quarto dia foi aplicada solução de DMH na dose de 40mg/Kg, sc, uma vez por semana, durante três semanas.

Grupo 5 (Controle Via Oral): Os animais receberam ração comercial, água *ad libitum* e ZnSO₄ (60mg/Kg), em duas doses de 30mg/Kg por dia por via oral (gavagem), durante todo o experimento. A partir do décimo quarto dia foi aplicado 1ml de solução de EDTA, via subcutânea, sc, uma vez por semana, durante três semanas.

Grupo 6 (Controle Positivo): Os animais receberam ração comercial, água *ad libitum* durante todo o experimento. A partir do décimo quarto dia foi aplicada solução de DMH na dose de 40mg/Kg, sc, uma vez por semana, durante três semanas.

4.4 Substâncias utilizadas

4.4.1 Solução de 1,2 dimetilhidrazina

A solução de 1,2 dimetilhidrazina (DMH, Sigma Chemical CO, Mo, EUA) foi diluída na dose de 40mg/Kg em EDTA (37 mg/100ml de água destilada) no momento da aplicação.

4.4.2 Sulfato de zinco ($ZnSO_4$)

O $ZnSO_4$ foi fornecido gentilmente pela Farmácia Cruz Vermelha de Botucatu - SP, na forma de soluto e dissolvido em solução salina (0,9% NaCl) no momento de uso, quando utilizada a via intraperitoneal. Para a via oral (gavagem) o $ZnSO_4$ foi dissolvido em água filtrada no momento de uso. O tratamento com o mineral aos foi realizado na dose de 60mg/kg, em duas doses de 30mg/Kg por dia (um de manhã e uma a tarde), três vezes por semana.

4.5 Eutanásia, Coleta e Processamento do Material, e Quantificação de FCAs

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 ao final da quarta semana de tratamento. Após a narcose foi coletada amostra de sangue (1ml) e, em seguida fragmento do cólon (aproximadamente 1 cm) de cada animal para dosagens de zinco.

À necropsia foi feita remoção de todo cólon e reto, inspeção para observação da presença de alterações macroscópicas e lavagem em solução de NaCl 0,9% para a retirada de

resíduos fecais. Foi realizada a incisão da parede longitudinalmente na linha mesentérica no sentido cólon proximal/reto.

O cólon da cada animal foi estirado, acondicionado em pranchas de isopor e fixado em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas. Posteriormente, as peças foram lavadas em água por 12 horas e mantidas em álcool 70% até o momento da análise.

Para contagem de focos de criptas aberrantes (FCA), os cólons foram retirados do álcool 70%, lavados em água corrente e corados em solução de azul de metileno a 0,2% em PBS por aproximadamente 2 minutos.

O cólon foi cortado com navalha nas porções distal, medial e proximal, e cada porção foi colocada sobre uma lâmina. Os segmentos foram analisados em microscópio de luz convencional em objetiva de 40X (Axiostar plus, Zeiss). A identificação e quantificação dos FCAs foram baseadas em seus aspectos morfológicos diferenciais segundo Bird (1995), 1) tamanho aumentado e aspecto e aspecto basófilo com hipercromasia da região epitelial (camada de células epiteliais mais espessa) em plano (mais elevado) diferente das criptas intestinais normais circunjacentes; 2) abertura das criptas de aspecto alterado (circular a alongada, elíptica ou tortuosa); 3) Criptas aberrantes (CAs) isoladas ou em focos, designados como focos da criptas da cripta aberrantes (FCAs) que ocupam área maior que a ocupada por um número equivalente de criptas morfolologicamente normais. Não existem criptas de morfologia normal entre as criptas aberrantes dentro desses focos.

Foram quantificados os FCAs com 1, 2, 3, 4 ou mais criptas aberrantes (CAs), além de número total de CAs, número total de FCAs por segmento de cólon analisado, sendo padronizado o sentido de análise (cólon distal- cólon proximal).

O cólon proximal foi descartado, após análise dos FCAs, pois não apresentou numero de FCAs que justificasse seu processamento histológico.

As porções mediais e distais dos cólons foram incluídos como “swiss-roll”, fornecendo maior área de visão das criptas em disposição perpendicular, (**ver Anexo 3**) e colocados em cassetes plásticos. Todos os fragmentos foram então processados para obtenção de cortes histológicos, que foram corados pela hematoxilina-eosina (HE), e para reações de imunoistoquímica.

4.6 Índice de proliferação celular

A atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa do cólon foi estimada utilizando-se análise imunoistoquímica da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). As lâminas histológicas passaram pelos seguintes processos: desparafinização, bloqueio de peroxidases endógenas (20 minutos no peróxido de hidrogênio 3% em PBS), bloqueio de ligações inespecíficas (60 minutos no leite desnatado 1%), conjugação *over-night* com anticorpo primário específico diluído em BSA (1:100 monoclonal anti-PCNA, clone PC10, DakoCytomation); aplicação do polímero conjugado a peroxidase (pós-primário e anti-mouse/rabbit IgG – Poly HRP, Leica, por 30 minutos cada), revelação com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetracolorido (DAB, Sigma-Aldrich do Brasil, por 10 minutos), contra-coloração (Hematoxilina de Harris), desidratação e montagem.

Para análise de índices de proliferação celular foram examinadas 20 criptas perpendiculares na mucosa do cólon médio em cada animal, à microscopia óptica, com objetiva de 40x. Os índices de proliferação celular foram determinados pela porcentagem de células com núcleos marcados em marrom pelo PCNA em relação ao número total de células epiteliais analisadas. Os números de células epiteliais e o número de núcleos corados foram estimados em cada cripta, partindo-se da base em direção ao ápice da cripta (Ziliotto, 2008).

4.7 Índice de Apoptose

Os índices de apoptose foram quantificados, utilizando-se a coloração de cortes histológicos pela hematoxilina e eosina (HE). Para determinação de índices de apoptose, foi calculada a taxa de apoptose como a porcentagem de células apoptóticas (células com núcleo condensado ou fragmentado, formando corpos apoptóticos) em relação ao número total de células epiteliais de cada cripta de acordo com Dias et al. (2006).

4.8 Dosagem quali-quantitativa de zinco

As dosagens de zinco no sangue total, no cólon e nas fezes coletadas das caixas dos animais dos diferentes grupos experimentais foram realizadas no Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), do Instituto de Biociências (IB) da UNESP de Botucatu. Inicialmente as amostras foram submetidas à metodologia de mineralização por micro-ondas (Provecto modelo - DGT 100 Plus), seguindo o manual da Provecto Analítica, 2000. A seguir, foi realizada análise quali-quantitativa do zinco utilizando-se espectrofotômetro de absorção atômica (GBC – modelo AA932), através das técnicas de espectrometria por absorção atômica e atomização por chama.

4.9 Análise Estatística.

A análise estatística dos parâmetros analisados foi realizada através do programa software Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Os dados de peso corpóreo, o consumo de ração e água, índices de apoptose e de proliferação celular (PCNA), análise de criptas aberrantes (CA total, FCA total e FCA/CA) e níveis de zinco foram avaliados entre os diferentes grupos experimentais utilizando-se testes não paramétricos de ANOVA ou Kruskal-Wallis para amostras independentes. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1 Observações de biotério

A maioria dos animais mostraram-se clinicamente saudáveis durante todo o período de tratamento com o ZnSO_4 via oral, sendo que dois animais evoluíram para óbito, um do grupo **G4** (exposto ao ZnSO_4 via oral e DMH) e um do respectivo grupo controle (**G5**).

O tratamento com ZnSO_4 via intraperitoneal não foi tolerado pelos animais (**Figura 3**). Duas semanas após a aplicação do ZnSO_4 , os animais apresentaram sinais de morbidade como, pelos eriçados, dificuldade respiratória, conjutivite, corrimento ocular, diminuição do consumo de alimento e água, aumento do volume abdominal e diarreia. Sete animais evoluíram para óbito, cinco do grupo **G2** (exposição ao ZnSO_4 por via intraperitoneal e DMH) e dois do respectivo grupo controle (**G3**) no decorrer do experimento.

Foi possível realizar exame pós-morte de quatro animais que receberam ZnSO_4 via intraperitoneal (**G2**).

Os demais não foram necropsiados em decorrência do avançado estado de autólise e de canibalismo pelos outros animais da caixa. Dois animais do grupo **G2** (exposto ao ZnSO_4 via intraperitoneal e DMH) apresentaram ascite e peritonite fibrinosa. Dois animais deste mesmo grupo apresentaram distensões generalizadas de alças, intestino e estômago dilatado, e pulmões vinhosos.

Na análise histológica dos órgãos desses animais que evoluíram para óbito, grupo **G2** (exposição ao ZnSO_4 via intraperitoneal) foi observado peritonite fibrinosa no intestino e fígado de todos animais. Dois animais apresentaram edema e hemorragia alveolar (**ver Anexo 4**).]

5.2 Consumo de água e ração e peso corpóreo

A **Tabela 1** indica os valores de média e desvio-padrão do consumo médio de ração (g/rato/dia), água (ml/rato/dia), e ganho de peso corpóreo (g) dos animais dos grupos **G1**, **G2**, **G3**, **G4**, **G5** e **G6**.

Os animais dos grupos **G2** e **G3** (exposição ao ZnSO_4 via intraperitoneal) apresentaram consumo médio estimado de ração significativamente menor, quando comparados aos grupos **G1** (controle), **G4** e **G5** (exposição ao ZnSO_4 via oral) ($p \leq 0,001$), e significativamente menor, quando comparado ao **G6** (exposição a DMH) ($p \leq 0,001$).

O consumo médio estimado de água dos animais dos grupos que receberam ZnSO_4 via intraperitoneal (**G2** e **G3**) foi significativamente menor quando comparado aos animais dos grupos **G1** (controle) ($p \leq 0,01$), **G4** e **G5** (exposição ao ZnSO_4 via oral) e significativamente menor, quando comparado ao **G6** (exposição a DMH) ($p \leq 0,01$).

Em relação ao ganho de peso corpóreo, os animais dos grupos que receberam ZnSO_4 via intraperitoneal (**G2** e **G3**) apresentaram valores médios significativamente menores, quando comparados aos animais que receberam ZnSO_4 via oral (**G4** e **G5**), e aos animais do grupo controle (**G1**) ($p \leq 0,001$) (**Figura 2**).

Durante a necropsia, os animais do grupo **G2** e **G3** (exposição ao ZnSO_4 via intraperitoneal), apresentaram retenção de líquidos na cavidade, alças intestinais aderidas, estômago e cólon dilatado, e fígados pequenos e pálidos. O peso do fígado dos animais está representado na **Tabela 2**.

5.3 *Análise quantitativa de focos de criptas aberrantes (FCA).*

As criptas aberrantes foram detectadas estereoscopicamente pela coloração de azul de metileno.

Nos grupos que receberam a DMH (**G2, G4 e G6**), foram observados focos em sua maioria constituídos por uma cripta e, no máximo por duas criptas. O número total de CA, FCA e CA/FCA, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com o cancerígeno químico. Não foram detectadas lesões pré-neoplásicas nos animais que não receberam DMH (**G1, G3 e G5**) (**Tabela 3**).

5.4 *Índices de proliferação celular e apoptose*

Os índices de proliferação celular pelo PCNA na mucosa do cólon nos diferentes grupos experimentais são apresentados na **Tabela 3**. Os grupos tratados com DMH (**G2, G4 e G6**) apresentaram aumento significativo da taxa de proliferação celular, quando comparados aos grupos não tratados com DMH (**G1, G3 e G5**) ($p \leq 0,01$).

O tratamento com ZnSO_4 por via oral e por via intraperitoneal não alterou as taxas de proliferação das células epiteliais da mucosa do cólon tanto nos grupos iniciados (**G2 e G4**), bem como nos grupos não iniciados (**G3 e G5**).

A **Tabela 5** apresenta os índices de apoptose na mucosa do cólon nos diferentes grupos experimentais. Os grupos tratados com DMH (**G2, G4 e G6**) apresentaram aumento significativo de corpos apoptóticos, quando comparados aos grupos controles não tratado com DMH (**G1, G3 e G5**) ($p < 0,01$).

O tratamento com ZnSO_4 por via oral e por via intraperitoneal não alterou corpos apoptóticos das células epiteliais da mucosa do cólon tanto nos grupos iniciados (**G2 e G4**), bem como nos grupos não iniciados (**G3 e G5**).

5.5 Dosagem quali-quantitativa de zinco

5.5.1 Dosagem de zinco tecidual

A **Figura 4** indica os níveis de zinco dosados no cólon dos animais nos diferentes grupos experimentais. O nível de zinco tecidual dos animais do grupo **G2** (exposto ao ZnSO₄ por via intraperitoneal e DMH) apresentou-se menor quando comparado ao dos animais do grupo **G3** (exposto ao ZnSO₄ por via intraperitoneal).

Em relação à exposição ZnSO₄ por via oral, os animais do grupo **G4**, também exposto a DMH, apresentaram menor nível de zinco tecidual, quando comparado aos animais do grupo **G5** (exposição ao ZnSO₄).

Os níveis de zinco tecidual dos animais expostos ao ZnSO₄ por via intraperitoneal (**G2 e G3**) apresentaram-se maiores, quando comparados aos animais dos grupos expostos a este elemento por via oral (**G4 e G5**).

Os animais dos grupos não expostos ao ZnSO₄, **G1** (controle) e **G6** (exposição a DMH), apresentaram níveis de zinco tecidual similares e menores quando comparados aos demais grupos expostos ao ZnSO₄ (**G2, G3, G4 e G5**).

5.5.2 Dosagem de zinco no sangue

A **Figura 4** indica os níveis de zinco dosados no sangue dos animais nos diferentes grupos experimentais. Os grupos que receberam ZnSO₄ por via intraperitoneal (**G2 e G3**), assim como os grupos que receberam ZnSO₄ por via oral (**G4 e G5**), na presença de DMH ou não, apresentaram níveis de zinco sérico similares, e maiores quando comparados aos grupos não expostos a este elemento, **G1** (controle) e **G6** (exposto a DMH).

Os animais dos grupos não expostos ZnSO₄, **G1** (controle) e **G6** (exposto a DMH), apresentaram níveis de zinco tecidual similares.

5.5.3 Dosagem de zinco nas fezes

Os níveis de zinco dosados nas fezes dos animais nos diferentes grupos experimentais são apresentados na **Figura 5**. Em relação às dosagens de zinco nas fezes em diferentes horários (8, 16 e 24 horas) após a aplicação do ZnSO_4 , foi observado que em todos os grupos experimentais houve aumento do nível de zinco nas fezes, 16 horas após a aplicação do ZnSO_4 e redução dos níveis de zinco, 24 horas após a aplicação do mesmo.

Os animais do grupo que recebeu ZnSO_4 , por via intraperitoneal, associado com DMH (**G2**), apresentaram menor nível de zinco nas fezes, em relação ao grupo que recebeu este elemento por esta mesma via, não associado com DMH (**G3**) nos diferentes horários, após aplicação do ZnSO_4 .

Os animais do grupo que recebeu ZnSO_4 , por via oral associado com DMH (**G4**), apresentaram menor nível de zinco nas fezes, em relação ao grupo que recebeu este elemento por esta mesma via, não associado com DMH (**G5**) nos diferentes horários, após aplicação do ZnSO_4 .

Os grupos que receberam ZnSO_4 por via oral (**G4 e G5**), apresentaram maiores níveis de zinco nas fezes, em relação aos grupos que receberam este elemento por via intraperitoneal (**G2 e G3**) nos diferentes horários após aplicação do ZnSO_4 , sendo a diferença mais evidente na análise de 16 horas após aplicação deste elemento.

O grupo não exposto ao ZnSO_4 , **G1** (controle), mostrou menor nível de zinco nas fezes, quando comparado aos demais grupos expostos a este elemento.

6. Discussão

Nossos resultados demonstram que durante o tratamento com ZnSO_4 via oral a maioria dos animais mostraram-se clinicamente saudáveis, embora dois animais evoluíssem para óbito, um do grupo **G4** (exposto ao ZnSO_4 via oral e DMH) e um do respectivo grupo controle (**G5**). A ocorrência destes óbitos pode ser consequência de erro técnico no momento da aplicação do ZnSO_4 por meio de gavagem, pois estes animais mostraram-se clinicamente saudáveis no decorrer do experimento.

Não foi possível realizar exame pós-morte destes animais, devido ao avançado estado de autólise e de canibalismo pelos outros animais da caixa.

Durante o tratamento com ZnSO_4 via intraperitoneal, os animais apresentaram sinais de morbidade, sendo que sete animais evoluíram para óbito. Esses resultados são similares aos observados por Domingos et al. (1988), em estudos compostos de zinco, incluindo o ZnSO_4 por via intraperitoneal em roedores. Estes autores observaram os mesmos sinais de morbidade, seguidos por casos de óbitos como observados no nosso estudo.

A dose de 60mg/Kg de ZnSO_4 foi quatro vezes maior que a recomendada (15mg/dia) para um indivíduo de 70Kg (Tapiero and Tew, 2003). A dose de ZnSO_4 foi escolhida com base em relatos anteriores de efeitos benéficos do ZnSO_4 em outros modelos experimentais com roedores (Di Leo et al., 2001). Assim, mesmo em altas doses o zinco administrado tanto por via oral, bem como intraperitoneal não foi capaz de exercer efeito protetor na etapa de iniciação da carcinogênese do cólon induzida pela DMH no rato. Além de ter levado os animais que receberam este metal intraperitonealmente às condições de morbidade e, posteriormente a óbito.

No exame pós-morte de alguns animais do grupo **G2** (exposição ao ZnSO_4 via intraperitoneal e DMH), foi constatado ascite, peritonite fibrinosa, distensão generalizada de alças, intestino e estômago dilatado, e pulmões vinhosos. Na análise histológica todos os animais apresentaram peritonite fibrinosa no intestino e fígado. A dose de 60mg/Kg de ZnSO_4 administrada por via intraperitoneal, pode ter sido alta, causando lesão tecidual e toxicidade local, pelo contato direto com o peritônio, e conseqüentemente, com o estômago, intestino e fígado, sem sofrer alterações que freqüentemente ocorrem no trato digestivo pela via oral. A grande oferta do metal aos animais, pode ter excedido as necessidades fisiológicas e ultrapassado o mecanismo de controle homeostático do metal no organismo desses animais, tornando-os com sinais de morbidade citados acima, e posteriormente levando-os a óbito. A relação entre consumo de zinco e saúde é afetada por fatores fisiológicos homeostáticos e por fatores extrínsecos como exposição excessiva ao metal ou exposição a concentrações na faixa aceitável, necessária para vários processos metabólicos e bioquímicos (Hettich and Wibbertmann, 2001).

Dois animais apresentaram edema e hemorragia alveolar. Estes resultados são similares aos encontrados por Hettich and Wibbertmann (2001) que observaram efeitos agudos de toxicidade local em roedores após a inalação ou instilação intratraqueal de compostos de zinco, que incluiu edema alveolar, aflição pulmonar e infiltração de leucócitos no pulmão.

Hempe and Cousins (1992), em estudo de absorção de zinco em ratos observaram que a homeostase do metal no organismo pode envolver proteínas de ligação a metais, como proteínas intestinais ricas em cisteínas (CRIP's) e metalotioneínas (MTs). O zinco liga-se a CRIP, para poder ser absorvido pelas células, e a metalotioneína regula a ligação do zinco a CRIP, o que impede a absorção excessiva de zinco na mucosa intestinal. Outros mecanismos desconhecidos também podem existir. Normalmente observa-se que, quando o zinco está em

concentrações aumentadas no lúmen intestinal, a proporção de zinco citossólico associado às CRIP's diminui e há concomitantemente aumento de ligação às MTs (Goyer, 1996; Christian et al., 1998). Portanto, a exposição ao sulfato de zinco na dose de 60mg/Kg por via intraperitoneal deve ter excedido a capacidade da metalotioneína de se ligar ao metal e atuar no controle de absorção excessiva. Desta forma, foi possível observar em nosso estudo, sinais de morbidade nos animais e, subsequentemente casos de óbitos (Goyer, 1996; Christian et al., 1998).

Outra possibilidade que pode ter levado esses animais à essas condições, e posteriormente a óbito, seria a possível redução dos níveis de cobre causada pela alta exposição ao zinco. O zinco em altos níveis de exposição pode interagir com outros oligoelementos, especialmente o cobre, resultando na sua redução. Sugerem-se que alguns dos sinais de toxicidade por alto consumo de zinco pode ser atribuído a indução da deficiência de cobre (Hill and Matrone, 1970). Estes autores consideram que os elementos com características semelhantes como o zinco e cobre, atua de forma biologicamente antagônica à outra, como um resultado de competição por sítios de ligação as proteínas que requerem metais como co-fatores. Além disso, estudos tem mostrado que a alta exposição ao zinco altera os níveis de ferro e cálcio (Bremner and Beattie, 1995). A observação de sinais de toxicidade, como anemia em animais que receberam altas doses de zinco é geralmente atribuída a indução de deficiência de cobre por alta exposição ao zinco (Hettich and Wibbertmann, 2001).

Na análise histológica dos órgãos dos animais que sobreviveram até o momento de eutanásia, foi observada peritonite fibrinosa hepática, o que pode ser atribuído a irritação tecidual causada pela administração intraperitoneal do ZnSO_4 .

Segundo Hettich and Wibbertmann (2001) em humanos a intoxicação por ingestão acidental de grandes quantidades de zinco (1000-2500mg/L) na água em curto prazo, levou a

efeitos gastrointestinais, como dores abdominais, vômitos e diarreia, além de anemia, e esses sintomas foram reversíveis com a interrupção da ingestão do metal. Sintomas semelhantes levando a morte, tem sido relatado após administração de grandes doses de zinco intravenosa em paciente em diálise renal, expostos ao zinco através do uso de água armazenada em unidades galvanizadas, os sintomas da toxicidade do zinco foram reversíveis quando a água foi submetida a filtração com carbono ativado (Hettich and Wibbertmann, 2001)

Nossos resultados demonstram que os animais expostos ao ZnSO_4 via intraperitoneal (**G2** e **G3**), apresentaram valores médios significativamente menores de consumo de ração e água, peso corpóreo e ganho de peso corpóreo, quando comparados aos animais dos grupos **G1** (controle), **G4** e **G5** (exposição ao ZnSO_4 via oral) e **G6** (exposição apenas a DMH). Estes resultados são similares aos observados por Domingos et al. (1988), e indicam que a exposição ao ZnSO_4 na dose de 60mg/Kg via intraperitoneal, interferiu na ingestão de alimentos e água, e conseqüentemente no ganho de peso corpóreo dos animais, o que pode ser atribuído aos possíveis efeitos de toxicidade do metal na dose administrada.

Não foram encontradas criptas aberrantes nos animais dos grupos não tratados com o cancerígeno químico, o que indica que o zinco na dose de 60mg/Kg administrado tanto por via intraperitoneal como por via oral não exerce ação iniciadora da carcinogênese do cólon. Esses resultados se somam a estudos *in vitro* de genotoxicidade, realizados com células de mamíferos, demonstrando que o zinco não é carcinogênico, mutagênico ou teratogenico (Vilkina et al., 1978; Kasprzak et al., 1988).

Nos animais dos grupos tratados com o cancerígeno (**G2** e **G4**), o ZnSO_4 na dose de 60mg/Kg administrado pelas duas vias, não alterou significativamente o número de CA, FCA e CA/FCA.

Esses resultados indicam que o ZnSO_4 na dose de 60mg/Kg administrado por via intraperitoneal, bem como via oral não inibiu o processo de iniciação da carcinogênese do cólon, o que pode ser atribuído à redução de zinco tecidual, que pode ter reduzido os níveis de enzimas antioxidantes, em que a presença do zinco exerce papel estrutural e funcional (Fascineli, 2001). A redução de zinco tecidual pode estar relacionada à agressão genotóxica ocasionada pela exposição à DMH, que por sua vez, gera estresse oxidativo, aumentando as espécies reativas de oxigênio. Dani et al. (2007) observaram redução dos níveis de zinco na mucosa do cólon, além de redução das atividades das enzimas superóxido-dismutase (SOD) em animais tratados com DMH.

O zinco é componente estrutural da superóxido-dismutase (SOD), enzima presente no citoplasma de todas as células e catalisa a conversão de dois radicais, o íon superóxido e peróxido de hidrogênio, reduzindo a toxicidade das espécies reativas do oxigênio. A SOD extracelular encontra-se em níveis reduzidos em situações de deficiência de zinco (Koury and Donangelo, 2003). Pequenos desvios na concentração fisiológica destas enzimas tornam difícil o desenvolvimento de suas atividades e pode exercer dano oxidativo de lipídeos, proteínas, e DNA (Mates and Sanchez-Jimenez, 1999).

Os níveis de zinco tecidual dos grupos expostos ao ZnSO_4 por via intraperitoneal (**G2** e **G3**) apresentaram-se maiores quando comparados aos grupos expostos ao sulfato de zinco por via oral (**G4** e **G5**), o que pode estar atribuído as diferentes vias de administração do metal, uma vez que a administração por via intraperitoneal não permite que o zinco sofra reações com outras substâncias do trato gastrointestinal, como ocorre na via oral, o que pode ter levado ao menor nível de zinco tecidual detectado nos animais que receberam o metal por via oral, e conseqüentemente, ao aumento de níveis de zinco excretados pelas fezes, observados nos diferentes horários após aplicação do sulfato de zinco. Portanto esses

resultados não influenciaram na ação inibidora do processo de iniciação da carcinogênese do cólon nas diferentes vias.

A semelhança dos níveis de zinco tecidual dos grupos **G1** (controle) e **G6** (exposto a DMH), deve-se ao fato de que esses grupos não receberam ZnSO_4 e que a DMH não interferiu na concentração de zinco tecidual endógeno dos animais do grupo **G6**.

Em relação aos níveis de zinco no sangue dos grupos que receberam o metal por via intraperitoneal (**G2** e **G3**) e por via oral (**G4** e **G5**) na presença de DMH ou não, não foi considerado diferença entre os grupos, demonstrando que a ação genotóxica da DMH, apesar de ter interferido na concentração de zinco tecidual exógeno, não interferiu na concentração de zinco no sangue dos animais que receberam DMH, o que indica que o efeito de genotoxicidade da DMH se restringe ao tecido da mucosa do cólon, o qual é representado como sítio específico da ação genotóxica da DMH (Rodrigues et al.,2002).

Os animais dos grupos não expostos ao ZnSO_4 , **G1** (controle) e **G6** (exposto a DMH), apresentaram níveis de zinco no sangue similares, o que indica que a DMH não interferiu na concentração de zinco no sangue dos animais do grupo **G6**.

Outra possibilidade que pode explicar a ausência da ação inibidora do ZnSO_4 no processo de iniciação da carcinogênese do cólon neste estudo, é a alta dose utilizada de ZnSO_4 , na dose de 60mg/Kg, que pode ter afetado a absorção de zinco pelas células epiteliais da mucosa do cólon, evidenciada pelo aumento de excreção de zinco nas fezes no período de 16 horas após a aplicação intraperitoneal e/ou oral do ZnSO_4 nos grupos que receberam este elemento (**G2**, **G3**, **G4** e **G5**). Esses resultados podem estar atribuídos ao mecanismo de controle homeostático, diante de alta exposição ao metal, que influencia nos ajustes de absorção gastrointestinal e excreção exógena do metal pelas fezes (Cozzolino, 1997). Esses ajustes foram observados no período de 16 horas após a aplicação do metal, apresentado pelo maior nível de excreção de zinco pelas fezes dos grupos (**G2**, **G3**, **G4** e **G5**) o que indica que

é nesse momento que ocorre o ajuste homeostático do metal no trato gastrointestinal do rato quando exposto a alta dose do metal. Assim, a alta dose (60mg/Kg) aplicada nos animais por via intraperitoneal e/ou oral, resultou em alta excreção de zinco pelas fezes. Yang et al (1995) observaram que doses muito altas de consumo de zinco afetam a eficiência de absorção deste metal pelas células epiteliais da mucosa do cólon de ratos, e que aumento de excreção de zinco pelas fezes contribuem para regular a homeostase de zinco no trato gastrointestinal.

Há estudos que indicam que a administração de altas doses de zinco em roedores pode estar envolvida com expressões de proteínas de membranas plasmáticas de células intestinais das famílias ZnT, que são transportadoras de zinco e influenciam no seu metabolismo (Palmiter and Huang, 2004). Segundo os autores estas proteínas reduzem a concentração de zinco citoplasmático por seqüestro, secreção ou efluxo de zinco, em condições de excesso de zinco para poder alcançar o controle homeostático do metal no trato gastrointestinal.

Assim como os níveis de zinco tecidual detectados nos animais tratados com DMH apresentaram-se menores, quando comparados aos animais não tratados com DMH em ambas as vias, os níveis de zinco das fezes dos animais tratados com DMH, também apresentaram-se menores quando comparados aos animais que não receberam DMH. Estes resultados indicam que concentrações de zinco na mucosa do cólon foram reduzidas, em resposta à agressão genotóxica, ocasionada pela exposição à DMH (Dani et al., 2007), e conseqüentemente houve redução de zinco nas fezes desses animais.

O aumento da proliferação celular é condição importante na carcinogênese humana e experimental (Chang et al., 1997). A proliferação celular epitelial na mucosa do cólon pode ser afetada por substâncias inibidoras, e assim reduzir a chance de expressão do tumor e desenvolvimento da carcinogênese do cólon (Difronzo et al., 1987). Os resultados para proliferação celular obtidos neste estudo, demonstraram que a exposição a DMH aumentou significativamente a proliferação celular na mucosa do cólon, como observado pelo aumento

dos índices de marcação pelo PCNA nas células epiteliais expostas ao cancerígeno químico. A exposição ao ZnSO_4 na dose de 60mg/Kg administrado por via intraperitoneal e/ou oral não modificou as taxas de proliferação celular da mucosa do cólon, tanto nos grupos tratados com DMH, como nos respectivos grupos controles não iniciados. Portanto nossos resultados demonstram que o tratamento com ZnSO_4 (60mg/kg) por via intraperitoneal e/ou oral não interferiu na atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa do cólon.

Em relação ao índice de apoptose, os resultados do presente estudo demonstraram aumento significativo de corpos apoptóticos nas células epiteliais expostas ao cancerígeno químico. A exposição ao ZnSO_4 na dose de 60mg/Kg administrado por via intraperitoneal e/ou oral não modificou as taxas de apoptose da mucosa do cólon, tanto nos grupos tratados com DMH como nos respectivos grupos controles não iniciados. Nossos resultados não estão de acordo com os de Cho et al. (1994) que atribuíram o papel antitumoral do zinco a indução do processo de apoptose em roedores, pela participação deste metal em processos biológicos, como ativação da transcrição do gene p53, supressor tumoral, que induz o processo de apoptose frente à agressão celular. Segundo os autores, o zinco é responsável pela conformação funcional da proteína p53, desempenhando papel crítico na sua estrutura, o qual apresenta um átomo de zinco fortemente ligado que é necessário para a ligação do p53 ao DNA.

7. Conclusões

O ZnSO_4 administrado por via intraperitoneal e/ou oral na dose de 60mg/Kg, não interferiu no desenvolvimento de FCAs, bem como na atividade proliferativa e taxa de apoptose da mucosa do cólon, tanto nos grupos expostos ao cancerígeno químico, como nos respectivos grupos controles. Portanto o ZnSO_4 administrado por via intraperitoneal e/ou oral na dose de 60mg/Kg, não mostrou ação protetora da etapa de iniciação da carcinogênese do cólon induzida pela DMH em ratos Wistar machos.

A administração do ZnSO_4 na dose de 60mg/Kg por via intraperitoneal, mostrou ter efeitos de toxicidade, seguidos por casos de óbitos tanto em animais do grupo exposto ao cancerígeno químico, como em animais do respectivo grupo controle. Portanto a via intraperitoneal não é adequada para modelo experimental de tratamento com o ZnSO_4 .

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela CNPq (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

8. Referências bibliográficas

- Anetor, J.L., Wanibuchi, H., Fukushima, S., 2007. Arsenic exposure and its health effects and risk of cancer in developing countries: micronutrients as host defence. *Asian Pacific J. Cancer.* 8,13-23.
- Bird, R.P., 1995. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* 93, 55-71.
- Botti, A.S., 2001. Avaliação dos potenciais evocados auditivos de tronco cerebral em pacientes portadores de deficiência crônica de zinco por síndrome do intestino curto. [Dissertação]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Bremner, I., Beattie, J.H., 1995. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. *Proc Nutr Soc.* 54, 489-499.
- Cantero, B.B., 1989. Estudio sobre el mecanismo de acción del zincum metalico. *Homeop. Méx.* 2-14.
- Chang, W.L., Chapkin, R.S., Lupton, J.R., 1997. Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate marks for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 18, 721-730.
- Cho, Y., Gorina, S., Jafferey, P.D., Pavletich, N.P., 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science.* 265, 346-355.
- Christian, P., West, J.R.K.P., 1998. Interactions between zinc and vitamin A: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 435-441.
- Cozzolino, S.M.F., 1997. Biodisponibilidade mineral. *Rev. Nutr.* 10, 87-98.

- Dani, V., Goel, A., Vaiphei, K., Dhawan, D.K., 2007. Chemopreventive potential of zinc in experimentally induced colon carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 171, 10-18.
- Dias, M.C., Spinardi-Barbisan-, A.L.T.S., Rodrigues, M.A.M., Camargo, J.L.V., Terán, E., Barbisan L.F., 2006. Lack the chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *F. Chem. Toxicol.* 44, 877-884.
- Difronzo, G., Capelletti, V., Miodini, P., Bertario, G., 1987. Role of celular retionic acid binding proteína in patients with large bowel cancer. *Cancer Detect. Prev.* 10, 352-337.
- Di Leo, V., D'Incà, R., Barollo, M., Tropea, A., Fries, W., Mazzon, E., Irato, P., Cecchetto, A., Sturniolo, G.C., 2001. Effect of zinc supplementation on trace elements and intestinal metallothionein concentrations in experimental colitis in the rat. *Digest Liver Dis.* 33, 135-139.
- Domingos, J.L., Llobet, J.M., Patermain, J.L., Corbella, J., 1988. Acute zinc intoxication: comparison of the antidotal efficacy of several chelating agents. *Vet. Hum. Toxicol.* 30, 224-228.
- Fascineli, M.L., 2001. Estudo da ação do zinco na teratogenicidade produzida pelo arsênio em camundongos. [dissertação]. Universidade Estadual Paulisa, Botucatu.
- Finley, J.W., Briske, A.M., Reeves, P.G., Johnson, L.K., 1995. Zinc uptake and transcellular movement by CACO-2 cells: studies with media containing fetal bovine serum. *J. Nutr. Biochem.* 6, 137-144.
- Goyer, R.A., 1996. Toxic effects of metals in: Klaasen, C.D., Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons. Fifth. Mc Graw Hill, New York, pp. 691-736.

- Hempe, J.M., Cousins, R.J., 1992. Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats. *J Nutr.* 122, 89-95.
- Hettich, S., Wibbertmann, A., 2001. Environmental Health Criteria 221: Zinc. World Health Organization, Geneva, pp. 4-249.
- Hill, C.H., Matrone, G., 1970. Chemical parameters in the study on in vivo and in vitro interactions of transition elements. *Fed. Proc.* 29, 1474-1481.
- Instituto Nacional do Câncer., 2010. Estimativa de 2010: Incidência de Câncer no Brasil. INCA, Rio de Janeiro.
- Instituto Nacional do Câncer., 2001. Estimativa incidência e mortalidade por Câncer no Brasil. INCA , Rio de Janeiro.
- Kasprzak, K.S., Kovatch, R.M., Poirier, L.A., 1988. Inhibitory effect of zinc on nickel subsulfide carcinogenesis in Fisher rats. *Toxicology.* 52, 253-262.
- Klein, C., Creach, K., Irintcheva, V., Hughes, K.J., Blackwell, P.L., Corbett, J.A., Baldassare, J.J., 2006. Zinc induces ERK-dependent cell death through a specific Ras isoform. *Apoptosis.* 11, 1933-1944.
- Koury, J.C., Donangelo, C.M., 2003. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev. Nutr.* 16, 433-441.
- Mates, J.M., Sanchez-Jimenez, F., 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front. Biosci.* 4, 339-345.

- Mayer, D., Trocheris, V., Hacker, H.J., Villard, V., Murat, J.C., Bannasch, P., 1987. Sequential Histochemical and morphometric studies on preneoplastic and neoplastic lesions induced in rat colon by 1,2 dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*. 8, 155-161.
- Palmiter, R.D., Huang, L., 2004. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 744–751.
- Parkin, D.M., 2001 Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2, 533-543.
- Prasad, A.S., 2003. Zinc deficiency. *BMJ*. 326, 409-410.
- Rodrigues, M.A., Silva, L.A.G., Salvadori, D.M.S., Camargo, J.L.V., Montenegro, M.R., 2002. Aberrant crypt foci na colon cancer: comparison Between a short-and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in wistar rats. *Braz. J. Biol. Res.* 35, 351-355.
- Sandstead, H.H., 1999. Understanding zinc: recent observations and interpretations. *J. Lab. Clin. Med.* 124, 322-327.
- Shuttleworth, V.S., 1986. Zinc - in perspective. *Homoeop. J.* 75, 69-74.
- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), 2004. Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação (NEPA). Universidade de Campinas, UNICAMP. Disponível em URL: [http:// www.unicamp.br/nepa/taco](http://www.unicamp.br/nepa/taco).
- Takahashi, M., Wakabayashi, K., 2004. Gene mutations and altered gene expression in azoximethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.* 95, 475-480.
- Tapieiro, H., Tew, K.D., 2003. Trace elements un human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Phamacotherapy*. 57, 399-11.

- Tasman – Jones, C., 1992. Distúrbios no metabolismo de oligoelementos. In: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennet JC. Tratado de Medicina Interna. Ninth ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Cap.1, pp. 1204-1207.
- Vilkina, G.A., Pomerantzeva, M.D., Ramaya, L.K., 1978. Lack of mutagenic activity of cadmium and zinc salts in somatic and germ mouse cells. *Genetica*. 2212-2214.
- alth effects and research priorities for the 1990s. *Health Perspect.* 102, 5-46.
- Yang, B.S., Ishii, H., Satoh, A., Kato, N., 1995. Supplementation of dietary cysteine elevates kidney metallothionein in rats by a mechanism involving altered zinc metabolism. *J Nutr* 125, 1167-1174.
- Ziegler, T.R., Evans, M.E., Fernández-estívaris, C., Jones, D.P., 2003. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 229-261.
- Ziliotto, L., 2008. Modulação da carcinogênese do cólon pelo cogumelo *Agaricus blazei* no rato. [tese] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.

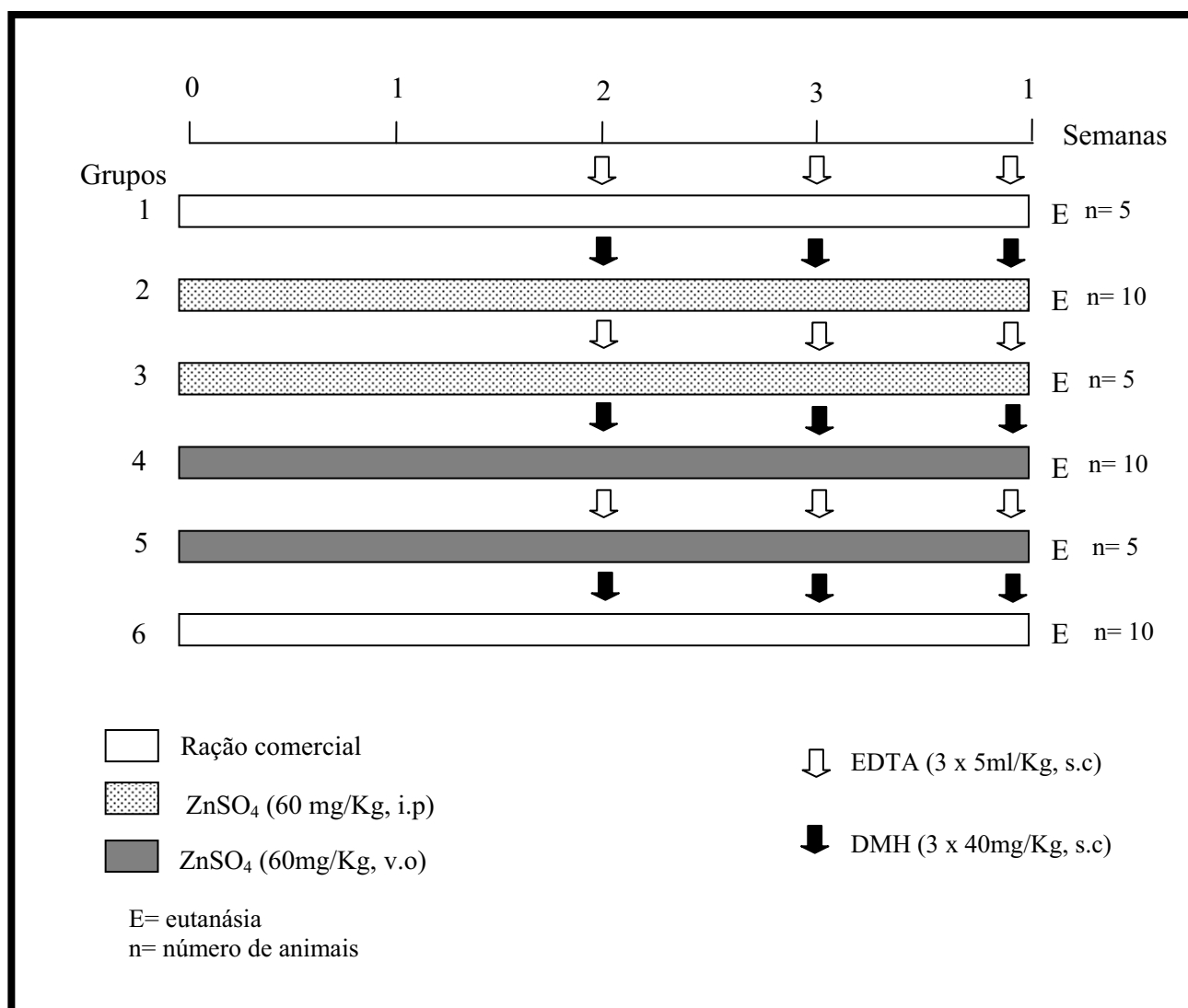


Figura 1 – Protocolo experimental sulfato do zinco (ZnSO_4).

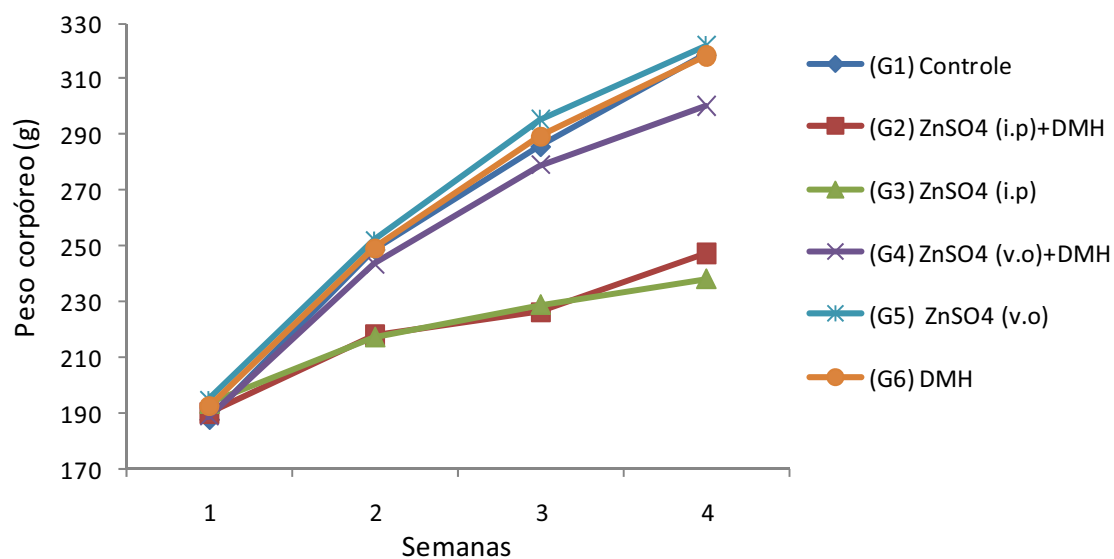


Figura 2 – Evolução do peso corpóreo médio dos animais nos diferentes grupos experimentais durante as 4 semanas de experimento.

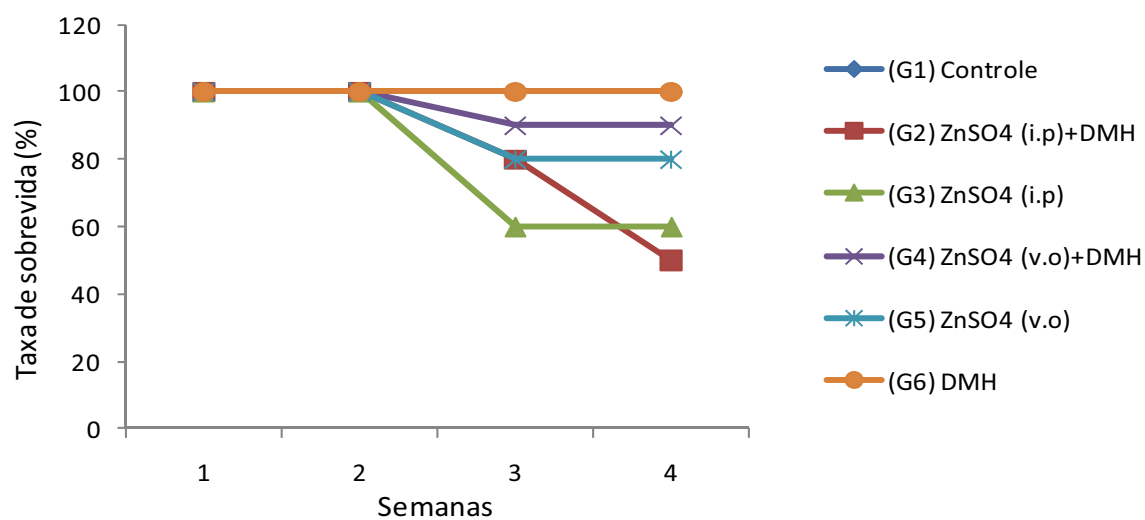


Figura 3 – Sobrevida dos animais nos diferentes grupos experimentais ao longo das 4 semanas de experimento.

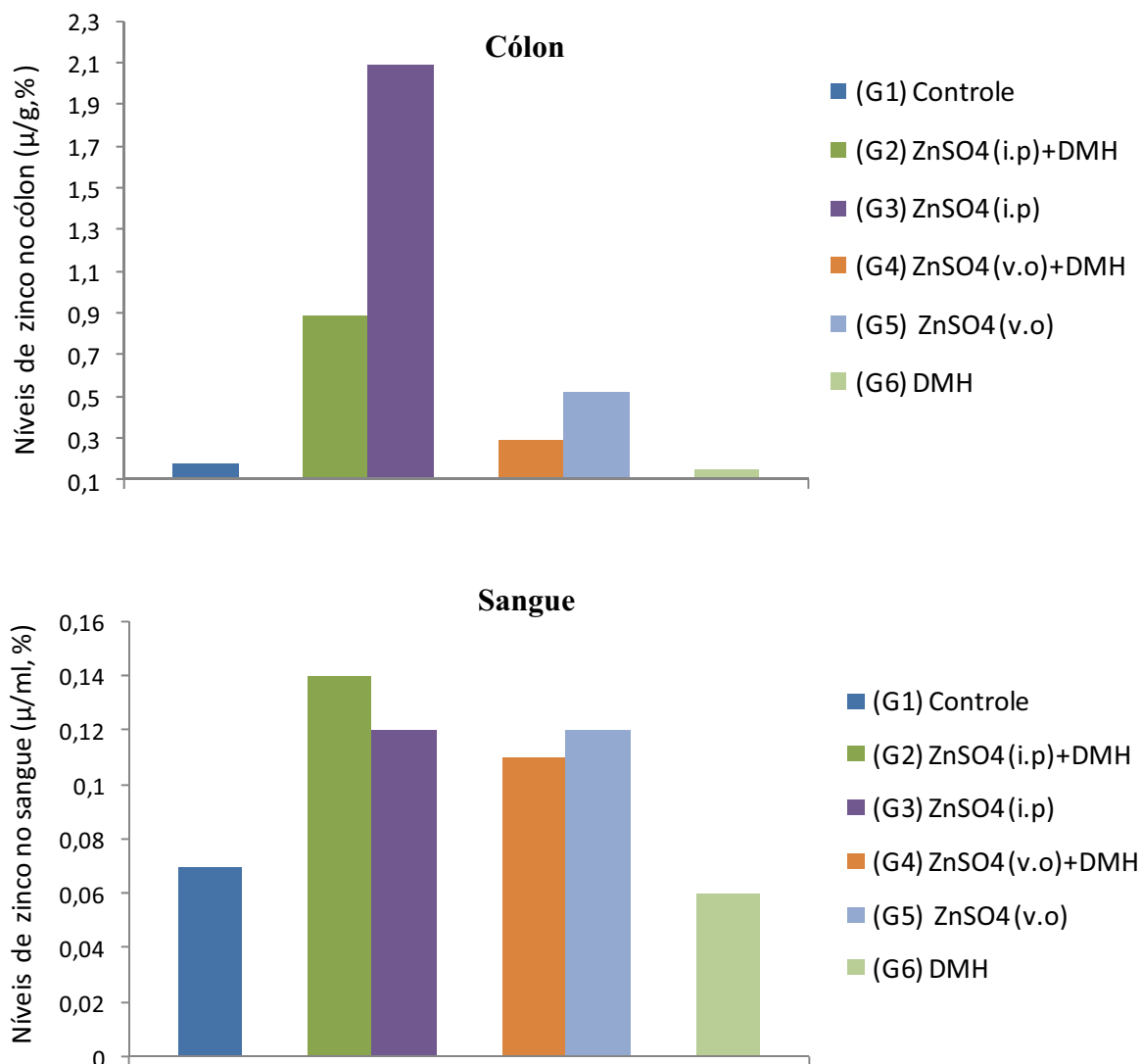


Figura 4 – Níveis de zinco no cólon ($\mu\text{g/g}$) e sangue ($\mu\text{g/ml}$) dos animais nos diferentes grupos experimentais ao final das 4 semanas de experimento.

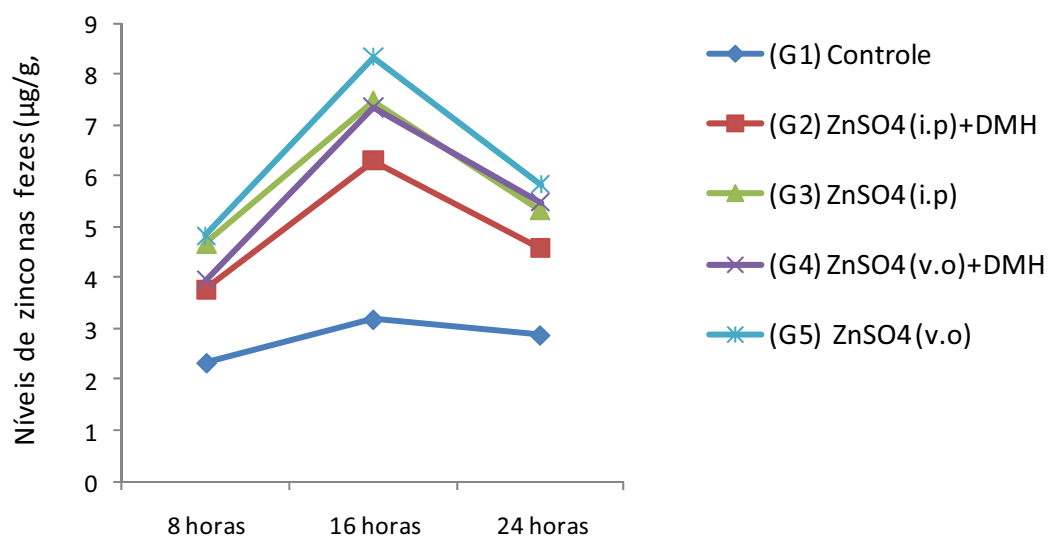


Figura 5 – Níveis de zinco nas fezes (µg/g) nos diferentes horários após aplicação do ZnSO₄ nos animais, ao longo das 4 semanas de experimento.

Tabela 1. Consumo estimado de ração e água, e ganho de peso durante as 4 semanas de experimento.¹

Grupo/tratamento ²	N	Consumo de ração (g/rato/dia)	Consumo de água (ml/rato/dia)	Ganho de peso (g)
(G1) Controle	5	26,77 ± 1,24 ^a	35,90 ± 3,18 ^c	131,40 ± 11,41 ^a
(G2) ZnSO ₄ (i.p) + DMH	10	14,87 ± 3,17 ^b	26,50 ± 4,18 ^d	56,83 ± 15,45 ^b
(G3) ZnSO ₄ (i.p)	5	14,02 ± 4,28 ^b	28,50 ± 4,18 ^d	43,66 ± 32,86 ^b
(G4) ZnSO ₄ (i.g) + DMH	10	25,58 ± 2,43 ^a	35,50 ± 4,07 ^c	110,77 ± 17,43 ^a
(G5) ZnSO ₄ (i.g)	5	26,87 ± 1,00 ^a	35,70 ± 4,51 ^c	127,40 ± 7,56 ^a
(G6) DMH	10	26,11 ± 1,28 ^a	35,70 ± 2,12 ^c	126,00 ± 10,77 ^a

¹Valores representados por média ± SD; ²DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/Kg p.c, s.c), ZnSO₄ = sulfato de zinco (60 mg/Kg i.g e i.p), N = número de animais. ^{a,b} Diferença significativa entre as médias dos grupos em relação ao consumo de ração e ganho de peso (G1=G4=G5= G6 > G2=G3, p ≤ 0,001). ^{c,d} Diferença significativa entre as médias dos grupos em relação ao consumo de água (G1=G4, G5, G6 > G2=G3, p ≤ 0,01).

Tabela 2. Peso do fígado dos animais ao final das 4 semanas de experimento¹.

Grupo/tratamento	N	Peso do Fígado (g)
(G1) Controle	5	10,60 ± 0,58 ^a
(G2) ZnSO ₄ (i.p) + DMH	5	7,58 ± 1,03 ^b
(G3) ZnSO ₄ (i.p)	3	8,26 ± 1,42 ^b
(G4) ZnSO ₄ (i.g) + DMH	9	10,88 ± 0,82 ^a
(G5) ZnSO ₄ (i.g)	4	10,54 ± 0,84 ^a
(G6) DMH	10	11,02 ± 0,92 ^a

¹Valores representados por média ± SD; ²DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/Kg p.c, s.c), ZnSO₄ = sulfato de zinco (60 mg/Kg i.g e i.p), N = número de animais. ^{a,b} Diferença significativa entre as médias dos grupos ($p \leq 0,01$).

Tabela 3. Efeitos da exposição ao sulfato de zinco sobre o número e multiplicidade dos FCA durante as 4 semanas de experimento¹.

Grupo/tratamento ²	N	CA Total	FCA Total	1 FCA	2 FCA	3 FCA	FCA > 4	CA/FCA
(G1) Controle	5	0	0	0	0	0	0	0
(G2) ZnSO ₄ (i.p) + DMH	5	33,20 ± 19,11	33,20 ± 19,12	33,20 ± 19,13	0	0	0	1,00 ± 0,00
(G3) ZnSO ₄ (i.p)	3	0	0	0	0	0	0	0
(G4) ZnSO ₄ (i.g) + DMH	9	19,83 ± 25,52	19,66 ± 24,73	19,50 ± 23,95	0,16 ± 0,86	0	0	1,00 ± 0,01
(G5) ZnSO ₄ (i.g)	4	0	0	0	0	0	0	0
(G6) DMH	10	26,70 ± 21,21	26,50 ± 21,01	26,30 ± 20,83	2,20 ± 0,42	0	0	1,00 ± 0,01

¹Valores representados por média ± SD; ²DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/Kg p.c, s.c), ZnSO₄ = sulfato de zinco (60 mg/Kg, i.g e i.p), N = número de animais; CA = Cripta Aberrante, FCA = Foco de Cripta Aberrante.

Tabela 4. Índice de proliferação nas células epiteliais do cólon nos diferentes grupos experimentais¹.

Grupo/tratamento²	Número de células/Criptas	Células PCNA⁺ (%)
(G1) Controle	34,94 ± 2,12	11,84 ± 1,29 ^a
(G2) ZnSO ₄ (i.p) + DMH	36,50 ± 2,84	21,62 ± 2,79 ^b
(G3) ZnSO ₄ (i.p)	33,86 ± 4,96	10,83 ± 0,18 ^a
(G4) ZnSO ₄ (i.g) + DMH	33,19 ± 1,49	20,05 ± 2,83 ^b
(G5) ZnSO ₄ (i.g)	33,47 ± 1,88	12,43 ± 0,48 ^a
(G6) DMH	33,60 ± 1,61	20,33 ± 5,03 ^b

¹Valores representados por média ± SD; ²DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/Kg p.c, s.c), ZnSO₄ = sulfato de zinco (60 mg/Kg, i.p e i.g), N = número de animais. ^{a,b}Diferença significativa entre as médias dos grupos (G1 = G3 = G5 < G2 = G4 = G6, p ≤ 0,01).

Tabela 5. Índice de apoptose nas células epiteliais do cólon nos diferentes grupos experimentais¹.

Grupo/tratamento²	Número de células/Cripta	Células em apoptose (%)
(G1) Controle	31,50 ± 0,96	0,03 ± 0,07 ^a
(G2) ZnSO ₄ (i.p) + DMH	32,28 ± 1,02	4,45 ± 1,12 ^b
(G3) ZnSO ₄ (i.p)	32,47 ± 2,15	0,05 ± 0,09 ^a
(G4) ZnSO ₄ (i.g) + DMH	31,01 ± 1,63	2,61 ± 1,10 ^b
(G5) ZnSO ₄ (i.g)	31,88 ± 0,58	0,04 ± 0,07 ^a
(G6) DMH	31,81 ± 1,66	3,98 ± 1,70 ^b

¹Valores representados por média ± SD; ²DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/Kg p.c, s.c), ZnSO₄ = sulfato de zinco (60 mg/Kg i.p e i.g), N = número de animais. ^{a,b}Diferença significativa entre as médias dos grupos (G1 = G3 = G5 < G2 = G4 = G6, p ≤ 0,01).

VI. Conclusões gerais

Conclusões Gerais

O Zinco na forma de quelato de zinco (ZnGly) administrado oralmente na dose de 15mg /Kg:

- 1) Não interferiu sobre a atividade proliferativa e taxa de apoptose das células epiteliais da mucosa do cólon, tanto no grupo exposto ao cancerígeno químico, como no respectivo grupo controle.
- 2) Não mostrou ação inibidora ou protetora da iniciação e promoção do câncer do cólon induzido pela DMH em ratos Wistar machos.
- 3) Não mostrou ação inibidora ou protetora da formação de lesões pré-neoplásicas (focos de criptas aberrantes) do cólon induzido pela DMH em ratos Wistar machos.

O Zinco na forma de sulfato de zinco (ZnSO₄) administrado por via oral e intraperitoneal na concentração de 60mg/Kg:

- 1) Não interferiu sobre a atividade proliferativa e taxa de apoptose das células epiteliais da mucosa do cólon, tanto no grupo exposto ao cancerígeno químico, como no respectivo grupo controle.
- 2) Não mostrou ação inibidora ou protetora da iniciação e promoção do câncer do cólon induzido pela DMH em ratos Wistar machos.
- 3) Não mostrou ação inibidora ou protetora da formação de lesões pré-neoplásicas (focos de criptas aberrantes) do cólon induzido pela DMH em ratos Wistar machos.
- 4) Mostrou ter efeitos de toxicidade, seguidos por casos de óbitos tanto em animais do grupo exposto ao cancerígeno químico, como em animais do respectivo grupo controle. Portanto a via intraperitoneal não é adequada para modelo experimental de tratamento com o sulfato de zinco (ZnSO₄).

VII. Anexos

ANEXO 1

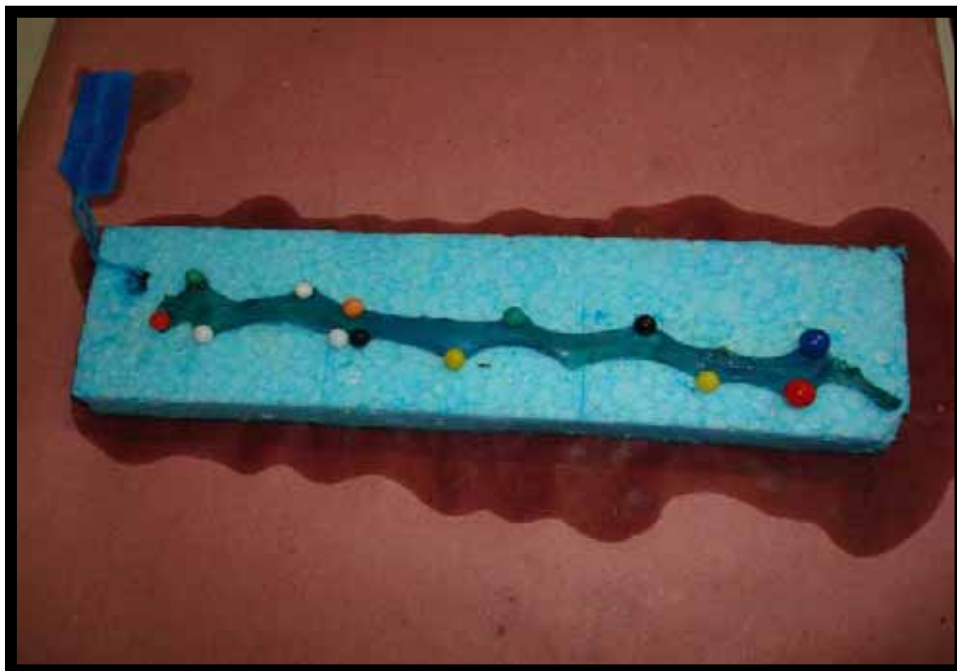


Figura 1 - Cólon fixado corado com azul de metileno a 0,2%.

ANEXO 2

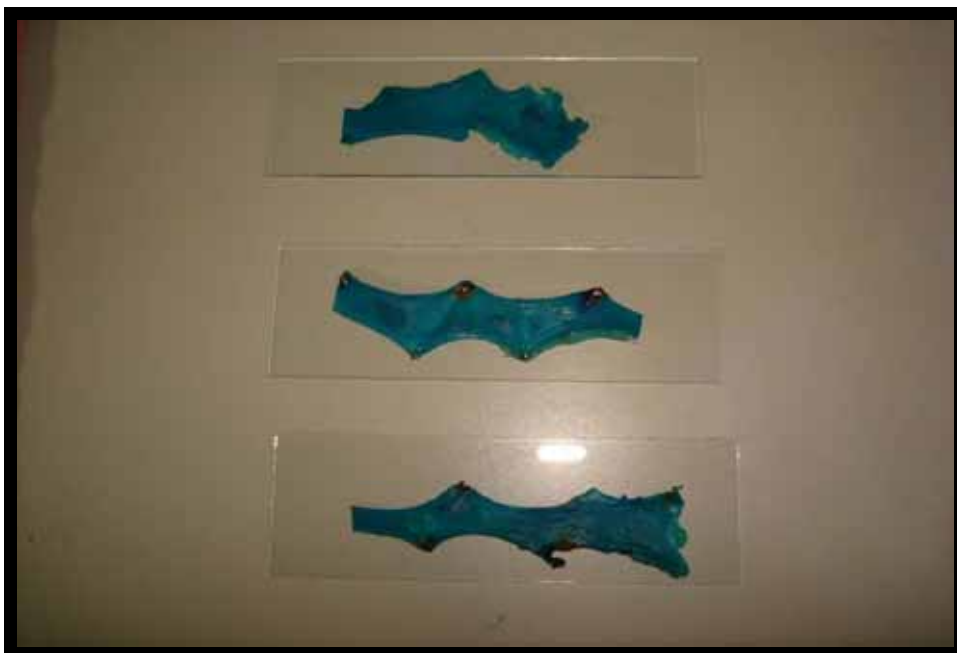


Figura 2 - Cólon nas porções distal, medial e proximal

ANEXO 3

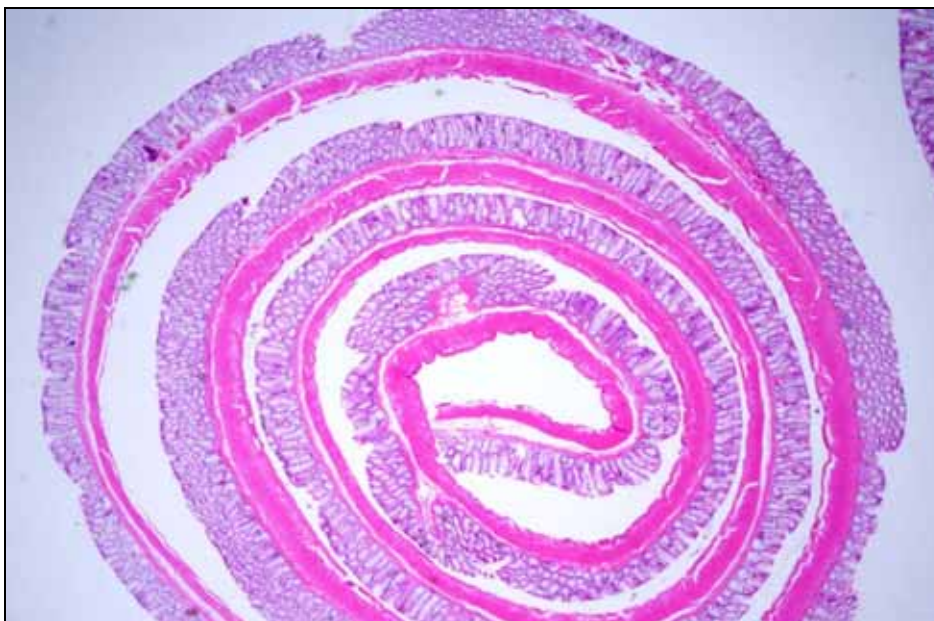


Figura 1- Corte histológico do cólon incluído pelo método de “Swiss-roll” de animal iniciado com DMH após 4 semanas de tratamento experimental (HE, objetiva de 10x).

ANEXO 4

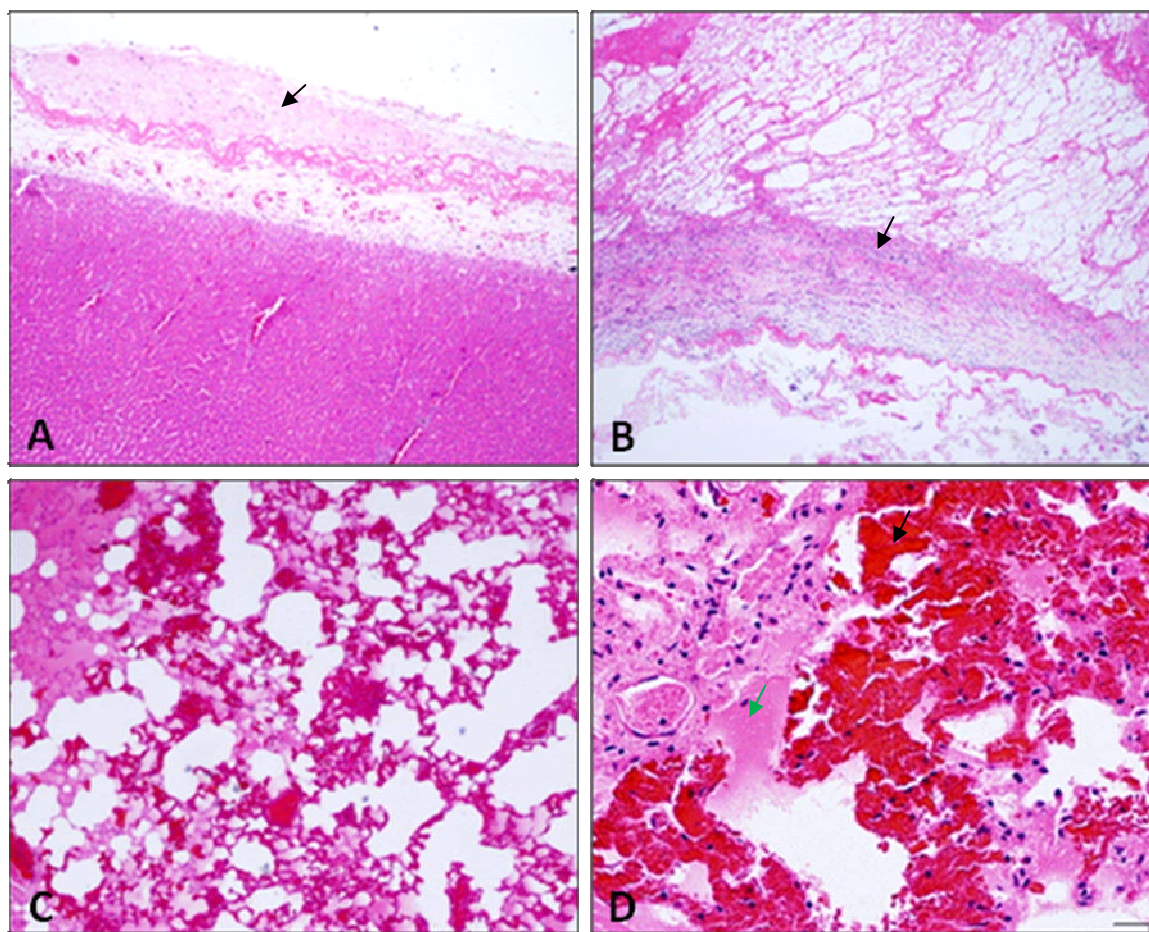


Figura 1 – Cortes histológicos do fígado (A) e do intestino (B) mostrando peritonite fibrinosa (setas). Pulmão (C e D) com edema e hemorragia alveolar (seta verde e preta, respectivamente), de animais que receberam ZnSO₄ por via intraperitoneal. A, B e C (HE, objetiva de 20x). D (HE, objetiva de 40x).

ANEXO 5

Tabela 1. Níveis de zinco no cólon, sangue e fezes dos animais nos diferentes grupos experimentais¹. Experimento Piloto.

Grupo/Tratamento ²	N	Cólon (µg/g)	Sangue (µg/ml)	Fezes (µg/g)
(G1) Controle	5	9,55	6,54	260,51
(G2) ZnGly	5	11,81	48,3	500,52

¹Valores representados em pool; ² ZnGly = quelato de zinco (227 mg/l), N = número de animais.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.

CEP: 18.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 731 sobre o projeto de pesquisa "Influência da dieta ocidental em modelo de carcinogênese pela dimetilhidrazina no rato", a ser conduzido por Flávia Regina Moraes da Silva, orientada pela Profª Drª Maria Aparecida Marchesan Rodrigues Kabayasi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a sanidade dos mesmo.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 30/04/2009.

Profª Drª Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA