UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**AVALIAÇÃO DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS EM CÓLON DE RATOS
TRATADOS COM O CORANTE COMERCIAL CI DISPERSE BLUE 291**

FABRICIANO PINHEIRO

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE.**

Orientadora:

Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros

São Paulo

2006

18670

FABRICIANO PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS EM CÓLON DE RATOS
TRATADOS COM O CORANTE COMERCIAL CI DISPERSE BLUE 291**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Toxicologia e Análises Toxicológicas.**

Orientadora:

Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros

São Paulo

2006

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012306

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pinheiro, Fabriciano
P654a Avaliação de lesões pré – neoplásicas em cólon de ratos tratados
com o corante comercial CI Disperse Blue 291 / Fabriciano
Pinheiro. -- São Paulo, 2006.
94p. *46 P*

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Barros, Silvia Berlanga de Moraes

1. Toxicologia ambiental 2. Carcinogênese química 3. Corante
I. T. II. Barros, Silvia Berlanga de Moraes, orientador.

615.9 CDD

FABRICIANO PINHEIRO

Avaliação de lesões pré-neoplásicas em cólon de ratos tratados com o corante
comercial CI Disperse Blue 291

Comissão Julgadora da
dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros
Orientadora/presidente

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
1 ° examinador

Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
2 ° examinador

São Paulo, 18/09 de 2006.

FABRICIANO PINHEIRO

A Deus,
por ser meu guia, minha maior segurança e
por nunca me deixar desamparado.

Aos meus pais (João e Olivia),
pela formação da minha pessoa e construção do meu caráter.
Por não medirem esforços para me ver crescer na vida. AMO VOCÊS!

Aos meus irmãos (Fabiano e Tiago),
por estarem sempre ao meu lado, independente da distância,
apoiando-me e incentivando-me. AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros, pela acolhida, pela oportunidade de crescimento, pela orientação, pela constante atenção e pelo exemplo profissional.

À Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelo carinho e confiança.

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan e à Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, pelas observações pertinentes e sugestões no exame de qualificação.

À Claudia Campos, que dividiu comigo os momentos felizes e tristes durante praticamente todo esse trabalho. Você é muito especial pra mim.

A todos da minha família, que estiveram sempre me apoiando e incentivando neste tempo.

Aos amigos de casa, George Oliveira, Filmon Solomon, Rafael Menck, Renato Almeida, Rodrigo Spricigo, Sidnei Silva e Tiago Peixe, pelo companheirismo, pela vivência e crescimento.

Aos amigos da pós-graduação, pela solidariedade e apoio nos momentos fáceis e difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Patologia, pela grande ajuda, pelas alegrias e comilanças.

Aos colegas da CETESB, pela convivência e auxílio nesses anos.

Aos amigos do TOXICAN - UNESP/Botucatu, em especial Rodrigo Otávio, pela ajuda na realização de parte deste trabalho.

Aos amigos de Botucatu e Bebedouro, pelos momentos de apoio e alegria.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Meus agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
ABREVIATURAS	viii
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. CORANTES TÊXTEIS E MEIO AMBIENTE.....	1
I.2. CORANTES AZO: ASPECTOS TOXICOLÓGICOS	3
I.3. CARCINOGENESE QUÍMICA DE CÓLON.....	8
I.4. FLORA BACTERIANA E METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS	17
II. OBJETIVO.....	21
III- METODOLOGIA	22
III.1. ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO	22
III.2. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.....	23
III.3. DOSE ADMINISTRADA DO DB291	23
III.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	24
III.4.1. Teste do cometa	24
III.4.2. Teste dos focos de criptas aberrantes	25
III.5. VIABILIDADE CELULAR E TESTE DO COMETA	29
III.6. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS ÓRGÃOS	31

III.7. ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE FCAS	32
III.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
IV. RESULTADOS.....	34
IV.1- OBSERVAÇÃO GERAL DOS ANIMAIS	34
IV.2- PESO CORPÓREO	35
IV.3- PESO RELATIVO DE FÍGADO E RINS	38
IV.4- TESTE DO COMETA.....	39
IV.5- ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	40
IV.6- ANÁLISE QUANTITATIVA DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES.....	42
V. DISCUSSÃO.....	47
VI. CONCLUSÕES	57
VII. REFERÊNCIAS.....	58

RESUMO

PINHEIRO, F. **Avaliação de lesões pré-neoplásicas em cólon de ratos tratados com o corante comercial CI Disperse Blue 291**. 2006. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O composto estudado neste trabalho foi o corante comercial CI Disperse Blue 291 (DB291), que contém o aminoazobenzeno 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida. Esse produto é um azo-corante disperso usado largamente pelas indústrias têxteis para o tingimento de poliéster e pode ser encontrado em ambientes aquáticos oriundo da descarga de efluentes industriais, podendo levar à exposição de humanos por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados. Portanto, faz-se importante a avaliação toxicológica do DB291. Este produto apresentou atividade mutagênica para linhagens de *Salmonella typhimurium* que possuem alta expressão das enzimas nitrorredutase e O-acetiltransferase. Tais enzimas também são expressas pelas bactérias da flora intestinal humana e de roedores e, desempenham importante papel na biotransformação de substâncias presentes na luz intestinal. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade do corante DB291 na indução de lesões pré-neoplásicas no cólon de ratos, avaliada pelo teste do cometa e pelo desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (FCAs). Resultados com 2, 8, 16 e 24 semanas de tratamento demonstraram que o DB291 não foi capaz de induzir FCAs em ratos tratados por gavagem com a dose de 50mg/kg de peso corpóreo, três vezes por

semana em dias alternados. Entretanto, resultados com o teste do cometa demonstraram que o corante foi capaz de causar danos ao DNA das células da mucosa do cólon de ratos tratados por via intra-retal. Estes resultados sugerem que o DB291 possui atividade genotóxica *in vivo*. Considerando a resposta genotóxica para o teste do cometa, a alta atividade mutagênica no teste Salmonella microssoma e o recente relato de que o DP291 causou danos em células de fígado humano (HepG2), faz-se necessário a realização de testes de carcinogênese de longa duração para avaliação segura do seu potencial carcinogênico, não somente em cólon, mas em outros órgãos tais como fígado e bexiga.

Palavras-chave: corante CI Disperse Blue 291; teste do cometa; focos de criptas aberrantes; carcinogênese química.

ABSTRACT

PINHEIRO, F. **Evaluation of preneoplastic lesions in colon of rats treated with the commercial disperse dye product CI Disperse Blue 291.** 2006. 94 f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The commercial disperse dye product CI Disperse Blue 291, which contain the aminoazobenzene CCN(CC)C1=CC=C(C=C1)C2=CC=C(C=C2)N3C(=C(C=C3)C(=O)OC)C4=CC=C(C=C4)N5C(=C(C=C5)C(=O)N)C6=CC=C(C=C6)N 2-[(2-bromo-4,6-dinitrophenyl)azo]-5-(diethylamino)-4-methoxyacetanilide (CAS registry no. 56548-64-2) is used for polyester fibers dyeing. It can be released in the aquatic environment through the discharge of industrial effluents. Humans can be exposed through the consumption of water and food contaminated with this product therefore its toxicological properties are important to be evaluated. This product showed elevated mutagenic activity with nitroreductase and O-acetyltransferase overproducing Salmonella strains. These enzymes are also expressed by human intestinal microflora, making intestines a possible target organ to the development of cancer after exposure to this product. The aim of this study was to investigate the effects of the commercial disperse dye product containing the CI Disperse Blue 291 on rat colon carcinogenesis, evaluated by the single cell gel assay (comet assay) and by aberrant crypt foci development. Results within different experimental periods showed the DB291 were not able to induce preneoplastic lesions in the colon of rats orally treated with 50mg/kg b.w., three times a week. The DB291 induced damages in the DNA of the rats

colon mucosa, evaluated by the comet assay. These data indicate that the DB291 showed genotoxic activity in the colon mucosa cells. Considering these results, the mutagenic activity with Salmonella test and the recent data that the DB291 presents toxicity to human liver cells (HepG2), further long time carcinogenesis assays are needed to security evaluation of its carcinogenic potential, not only in colon, but also another organs like liver and kidney.

Keywords: dye C.I. Disperse Blue 291; comet assay; aberrant crypt foci; chemical carcinogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de biotransformação da 1,2-dimetilhidrazina. Modificado de LAMONT; O’GORMAN, 1978.....11**
- Figura 2. Fotomicrografias de “nucleóides” de células de cólon corados com brometo de etídio e visualizados no teste do cometa. (a) nucléide sem lesão ou com lesões mínimas no DNA; b e c, nucleóides com lesões no DNA induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina. Aumento de 200x. Fotos cedidas pelo Msc. Rodrigo Otávio Alves de Lima.....14**
- Figura 3- Fotomicrografia de focos de criptas aberrantes (FCAs) em cólon de ratos. A) Identificados pela coloração de azul de metileno (20x); B) por HE (corte histológico) (50x). Fotos cedidas pelo Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan.....16**
- Figura 4- Biotransformação do 1-nitropireno em 1-aminopireno. Modificado de CHADWICK; GEORGE; CLAXTON, 1992.....20**
- Figura 5. Protocolo experimental A.....25**
- Figura 6. Protocolo experimental B.....27**

- Figura 7. Protocolo experimental C.....29
- Figura 8. A) Manchas de coloração azulada em regiões da cauda de animal tratado com o corante comercial CI Disperse Blue 291. B) Comparação da cauda de animal tratado e não tratado com o DP291.....34
- Figura 9. Evolução de peso corpóreo médio dos animais dos diferentes grupos experimentais. Períodos experimentais: A) 12 semanas; B) 20 semanas; C) 28 semanas.....37
- Figura 10. Fotomicrografia da mucosa de cólon de ratos). A) Animal sem nenhum tratamento (grupo 4C); B) Animal tratado com DMH mostrando foco de criptas aberrantes (grupo 5C). Coloração HE, aumento 40x.....41
- Figura 11. Aspecto macroscópico (A) e microscópico (aumento 40x) (B) de mucosa de cólon de rato, após 28 semanas da iniciação com DMH, mostrando presença de adenocarcinoma (grupo 5B).....43
- Figura 12. Fotomicrografia da mucosa de cólon de ratos. A) Animal sem nenhum tratamento (grupo 4C). B) Animal tratado com DMH mostrando FCAs (grupo 5B). Coloração azul de metileno, 0,1%; aumento 40x.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Nome usual, número CAS, estrutura e nome químico de alguns azo- corantes e metabólitos ou derivados.....	07
Tabela 2. Nome usual, número CAS, estrutura e nome químico de alguns mutagénos e/ ou carcinógenos químicos.....	12
Tabela 3- Exemplo de reações bioquímicas realizadas por bactérias intestinais, presentes nos mamíferos (GORBACH; GOLDIN, 1990).....	18
Tabela 4. Peso corpóreo final e ganho de peso dos animais iniciados ou não com DMH, nos diferentes grupos tratados ou não com o corante comercial CI Disperse Blue 291, durante 12 semanas de experimento.....	35
Tabela 5. Peso corpóreo final e ganho de peso dos animais iniciados ou não com DMH, nos diferentes grupos tratados ou não com o corante comercial CI Disperse Blue 291, durante 20 ou 28 semanas de experimento.....	36
Tabela 6. Peso corpóreo final e peso relativo de fígado e rins dos animais iniciados ou não com DMH, nos diferentes grupos tratados ou não	

com o corante comercial CI Disperse Blue 291, durante 12 semanas de experimento.....	38
Tabela 7. Peso corpóreo final e peso relativo de fígado e rins dos animais iniciados ou não com DMH, nos diferentes grupos tratados ou não com o corante comercial CI Disperse Blue 291, durante 20 ou 28 semanas de experimento.....	39
Tabela 8- Danos no DNA (<i>tail moment</i> e <i>tail intensity</i>) de células do cólon de ratos Wistar no diferentes tratamentos.....	40
Tabela 9. Número e multiplicidade de focos de criptas aberrantes na mucosa do cólon de ratos durante experimento de 12 semanas.....	44
Tabela 10. Número e multiplicidade de focos de criptas aberrantes na mucosa do cólon de ratos durante experimento de 20 semanas.....	45
Tabela 11. Número e multiplicidade de focos de criptas aberrantes na mucosa do cólon de ratos durante experimento de 28 semanas.....	45

Tabela 12. Efeito do ácido quenodesoxicólico e do corante comercial CI Disperse Blue 291 na promoção de focos de criptas aberrantes induzidos pela 1,2-dimetilhidrazina, durante 12 semanas de experimento.....	46
Tabela 13. Quantificação de focos de criptas aberrantes nos grupos induzidos pela 1,2-dimetilhidrazina, nos três períodos em estudo.....	46

ABREVIATURAS

1-NP - 1-nitropireno

1-AP - 1-aminopireno

a.C. - antes de Cristo

ANOVA - teste de análise de variância

AOM - azoximetano

AQ - ácido quenodesoxicólico

CAs - criptas aberrantes

DB291 - corante comercial CI Disperse Blue 291

DB79:1 - corante CI Disperse Blue 79:1

DL₅₀ - dose letal 50

DMH - 1,2-dimetilhidrazina

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ETAD - Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry

FCAs - focos de criptas aberrantes

HE - hematoxilina - eosina

IARC - International Agency for Research on Cancer

i.g. - intragástrica

INCA - Instituto Nacional de Câncer

i.r. – intra-retal

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

p.c. - peso corpóreo

PBS - solução salina tamponada com fosfato

PBTA-7 - derivado formado no processo de desinfecção do DB291

PhIP - 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine

SABESP - Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

s.c. - subcutânea

SCG - single cell gel assay

USEPA - United States Environmental Protection Agency

I. INTRODUÇÃO

I.1. CORANTES TÊXTEIS E MEIO AMBIENTE

Corantes podem ser definidos como substâncias intensamente coloridas que, quando aplicadas a um material, lhe conferem cor (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2005). Existem relatos do hábito de colorir tecidos no Egito, cerca de 3200 anos a.C., e na Índia há 2000 anos a.C. Nessa época predominavam os corantes naturais, provenientes principalmente de plantas e, os processos de tingimento eram bastante rudimentares (BECHTOLD et al., 2003). Atualmente, devido à tecnologia empregada no tingimento e às exigências do mercado consumidor em relação à diversidade de cores e tonalidades, resistência da cor à exposição à luz, lavagem, transpiração, etc, estima-se que cerca de 10.000 tipos de corantes são produzidos em escala industrial, sendo cerca de 30% destes disponíveis para a indústria têxtil (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Os processos industriais vêm ganhando especial atenção devido ao grande valor que tem sido atribuído ao consumo racional da água. Aliado a isso, pode-se mencionar algumas perspectivas preocupantes para o século que se inicia, como, por exemplo, a previsão feita pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) que estima que já em 2010 a demanda de água será superior a capacidade hídrica dos mananciais do estado (COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2005). Dentro desse contexto, o setor têxtil apresenta um

especial destaque, devido ao consumo de grandes volumes de água e produtos químicos usados nos processos de tingimento e lavagem dos tecidos. A presença de pequenas concentrações de corantes em efluentes é claramente visível e indesejável (ROBINSON et al., 2001). Estes efluentes, quando tratados inadequadamente, podem causar sérios problemas de contaminação ambiental.

Os corantes possuem em sua estrutura duas partes principais, pelas quais também podem ser classificados: o grupamento cromóforo e a estrutura responsável pela fixação à fibra (KUNZ et al., 2002). A classificação dos corantes baseada no grupo cromóforo, apresenta como mais relevantes os compostos azóicos e nitro, as antraquinonas e as quinolinas (GREGORY, 1990). A forma de fixação da molécula do corante às fibras geralmente é feita em solução aquosa e pode envolver basicamente 04 tipos de interações: ligação iônica, de hidrogênio, de Van der Waals e covalente. De acordo com o método de fixação à fibra, as principais classes de corantes são os reativos, os diretos, os ácidos e os dispersivos. Os corantes azóicos, ou azo, e que utilizam o método dispersivo de fixação à fibra, são considerados a classe mais importante para a indústria de tingimento, com participação em cerca de 50-65% das formulações comerciais (CHUNG; STEVENS, 1993; KROSCWITZ; HOWE-GRANT, 1993; KUNZ et al., 2002; RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997).

Os azo-corantes são compostos orgânicos, hidrofóbicos e que apresentam um ou mais grupamentos azo ($-N=N-$) ligados a grupos aromáticos. Quando presentes no meio ambiente possuem maior potencial de se ligar a sedimentos do que de permanecer na água, todavia, essa característica não é válida para os corantes

comerciais. Os produtos comercializados formulados com azo-corantes possuem agentes dispersantes que são substâncias capazes de emulsificar, dispersar ou solubilizar o corante em água, conseqüentemente, elevando os níveis dos mesmos nos corpos d'água (GARRISON; HILL, 1972; MAGUIRE; TKACZ, 1991).

As indústrias de tingimento consomem cerca de 7×10^5 toneladas/ano de corantes e pigmentos em todo mundo (NIGAM et al., 1996), sendo 26.500 toneladas somente no Brasil (GUARATINI; ZANONI, 2000). De acordo com Arslan, Balcioglu e Tuhkanen (1999), 20% dos corantes usados no processo de tingimento de tecidos são perdidos e despejados em ecossistemas aquáticos, conseqüentemente, seres humanos podem estar diretamente expostos pela ingestão de água e alimentos. Estudos relativos aos efeitos adversos dos corantes têxteis são escassos, devido principalmente a regulamentação falha ou inexistente para estes compostos e ao patenteamento de suas formulações, impossibilitando o conhecimento de suas estruturas químicas. Com isso, novos corantes e misturas comerciais são produzidos e utilizados sem serem adequadamente testados quanto à sua toxicidade.

I.2. CORANTES AZO: ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Em 1974 foi criada a ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers), organização internacional estabelecida para minimizar danos ambientais, proteger usuários e consumidores e para cooperar com governos e interesses públicos acerca do impacto toxicológico de seus produtos

(ANLIKER, 1979). Mais de 90% dos 4.000 corantes avaliados pela ETAD apresentaram valores para dose letal 50 (DL₅₀) oral superior a 2g/kg. Os maiores níveis de toxicidade encontrados foram contra corantes básicos e diazo diretos (ROBINSON et al., 2001).

Diazo-corantes diretos apresentam atividades mutagênica e/ou carcinogênica para animais. Estes efeitos são atribuídos a corantes que apresentam o grupo benzidina (Tabela 1) em sua estrutura química (CHUNG; CHEN; CLAXTON, 2006). Em revisão da mutagenicidade de azo-corantes verificou-se que a benzidina era a porção responsável pela atividade mutagênica dos diazo-corantes (CHUNG; STEVENS; CERNIGLIA, 1992). A produção e uso de benzidina em corantes foi banida nos Estados Unidos na década de 1970 após identificação desta substância como carcinógeno de bexiga em humanos. A IARC (International Agency for Research on Cancer) classifica corantes a base de benzidina como prováveis carcinógenos para humanos (Grupo 2A) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2006). A benzidina pode ser gerada pela redução de diazo-corantes por microorganismos da flora intestinal. Direct Black 38, Direct Blue 6 e Direct Brown 95 (Tabela 1) são exemplos de diazo-corantes diretos que após sofrer ação das azorredutases formam benzidina ou outros metabólitos derivados de benzidina (CHUNG; CHEN; CLAXTON, 2006).

Atualmente, apesar de ainda serem utilizados, os diazo-corantes diretos têm sido substituídos, principalmente nas indústrias têxteis, por corantes que se caracterizam por possuir somente um grupamento azo em sua estrutura química básica e ter método dispersivo como forma de fixação à fibra.

Os aspectos toxicológicos referentes a este grupo de monoazo-corantes dispersos são ainda bastante escassos na literatura. A USEPA (United States Environmental Protection Agency) avaliou os parâmetros físico-químicos e toxicológicos do monoazo-corante puro CI Disperse Blue 79:1 (DB79:1) (Tabela 1). Este corante administrado por gavagem a ratos, em doses que variaram de 50 a 500mg/kg de p.c., percorreu o trato gastrointestinal dos animais sendo pouco absorvido ou biotransformado. Através do “High Production Volume (HPV) Challenge Program”, programa que visa fazer uma triagem toxicológica de produtos químicos produzidos em larga escala - igual ou superior a 1 milhão de pounds/ano - (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006a), foram realizados ensaios de toxicidade aguda e crônica, teratogenicidade, mutagenicidade e ecotoxicidade com o DB79:1. O corante teve grande aceitabilidade para os parâmetros avaliados sendo negativo ou apresentando baixa toxicidade para os ensaios empregados; a única exceção aconteceu com o teste de Ames em que foi encontrada resposta mutagênica positiva para linhagens de *Salmonella typhimurium*, (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006b).

O composto estudado neste trabalho é o corante comercial CI Disperse Blue 291 (DB291), cuja molécula cromófora é o 2-[(2-bromo-4,6-dinitrofenil)azo]-5-(dietilamino)-4-metoxiacetanilida (Tabela 1). O DB291 é um monoazo-corante que possui agentes dispersantes aderidos a sua molécula cromófora e, é usado largamente pelas indústrias têxteis para o tingimento de poliéster.

O PBTA-7 (Tabela 1), derivado formado no processo de desinfecção do DB291, via redução com hidrossulfeto de sódio e subsequente cloração com hipoclorito de sódio, foi detectado em amostras de rios japoneses (WATANABE et al., 2002). Ambos, DB291 e PBTA-7, apresentaram resposta mutagênica para linhagens de *Salmonella typhimurium* (UMBUZEIRO et al., 2005b; WATANABE et al., 2002).

Excluindo os resultados de atividade mutagênica, nenhuma outra informação sobre efeitos tóxicos foi encontrada na literatura referente ao DB291.

De acordo com UMBUZEIRO et al. (2005b), o corante comercial CI Disperse Blue 291 apresentou atividade mutagênica para linhagens de *Salmonella typhimurium* que super expressam nitrorredutase (YG1021 e YG1041) ou O-acetiltransferase (YG1024 e YG1041) indicando um importante papel dessas enzimas na ativação deste composto. Por causa do relevante aumento da mutagenicidade observado para linhagem YG1041, a qual apresenta genótipo capaz de super expressar as duas enzimas citadas, sugeriu-se que o produto formado pela nitrorredução seja substrato para a O-acetilação. Considerando a habilidade das bactérias da flora intestinal de mamíferos na expressão dessas enzimas e a sua reconhecida atuação na biotransformação de substâncias presentes na luz intestinal (CHADWICK; GEORGE; CLAXTON, 1992; HICKMAN et al., 1998), os autores sugerem que possíveis substâncias eletrofílicas geradas deste composto tenham o intestino como importante órgão-alvo. Verificou-se o aumento da mutagenicidade na presença da fração S9 para as linhagens TA98NR, TA98, YG1021, TA98DNP6 e YG1024 indicando uma importante participação do citocromo P450 na ativação deste composto. A participação

de enzimas hepáticas na ativação deste corante indica também o fígado, como possível órgão-alvo do DB291 (UMBUZEIRO et al., 2005b).

Tabela 1- Nome usual, número CAS, estrutura e nome químico de alguns azo-corantes e metabólitos ou derivados.

Nome	Número CAS	Estrutura	Nome químico (IUPAC)
CI Disperse Blue 291	56548-64-2		2-[(2-bromo-4,6-dinitrophenyl)azo]-5-(diethylamino)-4-methoxyacetanilide
CI Disperse Blue 79:1	3618-72-2		N-[5-[bis[2-(acetyloxy)ethyl]amino]-2-[(2-bromo-4,6-dinitrophenyl)azo]-4-methoxyphenyl]acetamide
PBTA-7			2-[2-(acetilamino)-4-(diethylamino)-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole
Benzidina	92-87-5		Benzidine
CI Direct Black 38	1937-37-7		2,7-naphthalenedisulfonic acid, 4-amino-3-((4'-((2,4-diaminophenyl)azo)(1,1'-biphenyl)-4-yl)azo)-5-hydroxy-6-(phenylazo)-, disodium salt
CI Direct Blue 6	2602-46-2		2,7-naphthalenedisulfonic acid, 3,3'-((1,1'-biphenyl)-4,4'-diylbis(azo)) bis(5-amino-4-hydroxy-, tetrasodium salt

CI Direct Brown 95	16071-86-6		(5-((4'-((2,5-dihydroxy-4-((2-hydroxy-5-sulfophenyl)azo)phenyl)azo)(1,1'-biphenyl)-4-yl)azo)-2-hydroxybenzoato(2-))-disodium salt
CI Direct Blue 15	2429-74-5		2,7-naphthalenedisulfonic acid, 3,3'-((3,3'-dimethoxy(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl)bis(azo))bis(5-amino-4-hydroxy-, tetrasodium salt
CI Direct Red 2	992-59-6		1-naphthalenesulfonic acid, 3,3'-((3,3'-dimethyl(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl)bis(azo)) bis(4-amino-, disodium salt
Orto-tolidina	119-93-7		3,3'-dimethylbenzidine
Dianisidina	119-90-4		3,3'-dimethoxybenzidine

I.3. CARCINOGENESE QUÍMICA DE CÓLON

As neoplasias malignas que acometem o cólon são a quarta causa mais comum de câncer no mundo e a segunda em países desenvolvidos, sendo uma das principais responsáveis pelas mortes por cânceres. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa de novos casos de câncer no Brasil aponta o câncer do cólon como o quarto mais freqüente entre os homens e o terceiro entre as mulheres para o ano de 2006 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2006).

O processo de carcinogênese de cólon pode ser estudado através da indução de lesões por agentes químicos. A carcinogênese química é um processo de múltiplas etapas (PITOT, 1993; MOUSTACCHI, 1998). Duas dessas etapas estão bem caracterizadas: a iniciação e a promoção. Na etapa de iniciação, o agente químico genotóxico provoca alterações irreversíveis em genes relacionados com os processos de proliferação e reparo celular (DIXON; KOPRAS, 2004). A ocorrência eventual de proliferação celular reparativa compensatória, fixa estas lesões pré-mutagênicas no DNA, impedindo o reparo eficiente e morte celular por apoptose destas células, resultando no aparecimento de células filhas iniciadas (COHEN; ELLWEIN, 1990; MOUSTACCHI, 1998). A etapa de promoção envolve a seleção e proliferação clonal das células iniciadas, com posterior formação de nódulos e tumores (PITOT, 1993).

Existem vários modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* para o estudo do processo de carcinogênese de cólon. Banerjee e Quirke (1998) detalharam os principais modelos utilizados para o estudo da carcinogênese de cólon, destacando os que utilizavam culturas de células para ensaios *in vitro* e, indução por agentes químicos em roedores para ensaios *in vivo*.

Em 1967, Druckrey et al. demonstraram que a administração parenteral de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) (Tabela 2) resultava no desenvolvimento de câncer, tanto no intestino delgado quanto no cólon de ratos. Todos os animais desenvolveram neoplasia, e o cancerígeno mostrou-se seletivo em seus efeitos, pois foram encontradas somente neoplasias intestinais nos animais. A DMH apresenta alta especificidade para a mucosa do cólon de roedores, induzindo grande número de

tumores similares aos carcinomas do cólon humano (BANERJEE; QUIRKE, 1998; RUBIO et al., 1986). Assim, o modelo de carcinogênese experimental utilizando a DMH tem sido útil no estudo da biologia do câncer do cólon (BANERJEE; QUIRKE, 1998).

A DMH é um carcinógeno completo e sua ação genotóxica está relacionada com a metilação do material genético das células epiteliais do cólon (LAMONT; O'GORMAN, 1978). A iniciação pode ocorrer por duas vias. Após ser injetada subcutaneamente, a DMH é oxidada no fígado em duas etapas transformando-se em azoximetano. Posteriormente, por *N*-hidroxilação forma-se metilazoximetanol, que, o conjugado com o ácido glicurônico, é secretado pela bile. Ao atingir o intestino, é hidrolisado por β -glicuronidases produzidas pelas bactérias intestinais formando novamente metilazoximetanol. Este sofre oxidação convertendo na forma extremamente instável metilazoxiformaldeído, que é decomposto formando por último o íon carbônio (LAMONT; O'GORMAN, 1978; SOHN et al., 1991; WEISBURGER, 1971). Alguns autores relatam que a DMH e seus metabólitos hepáticos podem ser transportados até as células epiteliais do cólon via corrente sanguínea, sem serem secretados via bile (ZEDEK; GRAB; STERNBERG, 1977). Na Figura 1 está demonstrado o esquema da biotransformação da DMH.

Figura 1- Esquema de biotransformação da 1,2-dimetilhidrazina. Modificado de LAMONT; O'GORMAN, 1978.

Os modelos clássicos de carcinogênese química experimental *in vivo* geralmente requerem longo tempo de acompanhamento dos animais para observação de neoplasias, tornando-os dispendiosos e de execução trabalhosa. Por esta razão, existe grande interesse na padronização de ensaios que permitam detectar precocemente alterações que precedem o aparecimento da neoplasia (ITO et al., 1998). Essas alterações estão associadas a estágios iniciais do processo de carcinogênese e podem ser identificadas em nível molecular, celular ou morfológico (LIPPMAN et al., 1990; PEREIRA et al., 1994; WARD; HENDERSON, 1996).

Tabela 2- Nome usual, número CAS, estrutura e nome químico de alguns mutagénos e/ ou carcinógenos químicos.

Nome	Número CAS	Estrutura	Nome químico (IUPAC)
1,2-dimetildrazina	540-73-8		1,2-dimethylhydrazine
Azoximetano	25843-45-2		Azoxymethane
PhPI	105650-23-5		2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4,5-b)pyridine
1-nitropireno	5522-43-0		1-nitropyrene
3-nitro benzantrona	17117-34-9		3-nitrobenzanthrone

Entre os biomarcadores em nível celular, Ostling e Johanson (1984) apresentaram uma técnica micro-eletrorética para visualização direta de dano ao DNA celular. A um pequeno número de células irradiadas suspensas em uma fina camada de gel de agarose foi adicionada solução de lise, passaram por eletroforese e foram coradas com corante fluorescente. A corrente elétrica impulsionou os fragmentos de DNA quebrados provocando a migração dos mesmos. Através das imagens resultantes que tinham a aparência de “cometas”, era possível mensurar a extensão do dano ao

DNA das células. Devido às imagens obtidas, a técnica recebeu o nome de teste do cometa ou single cell gel assay (SCG) (Figura 2) (OSTLING; JOHANSON, 1984).

Nos últimos anos houve aumento de interesse na metodologia do teste do cometa, pois este teste pode ser usado em vários estudos, tanto *in vivo* como *in vitro*, para avaliar dano e reparo do DNA. Este interesse decorre do fato de se tratar de um método rápido, no qual as lesões no DNA podem ser vistas na ausência da atividade mitótica. Essa técnica possui as vantagens da utilização de um pequeno número de células, ter boa reprodutibilidade e ser aplicável em qualquer organismo eucarioto.

Esse teste é amplamente utilizado para se testar agentes genotóxicos, indução de danos e reparos no DNA, biomonitoramento de populações expostas, bem como relação entre ação genotóxica e carcinogênica de compostos químicos (MOLLER, 2005; MUSSALI-GALANTE et al., 2005; SASAKI et al., 2000)

A quantificação das quebras em DNA no teste do cometa pode mostrar facilmente o efeito de agentes genotóxicos. As partes do DNA que foram quebradas, em função da exposição ao agente genotóxico, migram num processo de eletroforese, formando uma figura obtida para cada núcleo celular composta de “cabeça” e “cauda”, o que ocasiona a semelhança a uma imagem de cometa. Assim, quanto maior for o dano causado no DNA, maior o número de partes de menor peso molecular livre e, portanto, maior será a cauda do cometa (FAIRBAIRN; OLIVE; O’NEILL, 1995; OSTLING; JOHANSON, 1984).

O teste do cometa, quando utilizado para detecção da atividade genotóxica *in vivo*, possui grande vantagem, pois permite a aplicação do teste em inúmeros órgãos, dentre eles o cólon (SASAKI et al., 2000; SEKIHASHI et al., 2001; TSUDA et al., 2000).

Figura 2. Fotomicrografias de “nucleóides” de células de cólon corados com brometo de etídio e visualizados no teste do cometa. (a) nucléide sem lesão ou com lesões mínimas no DNA; b e c, nucleóides com lesões no DNA induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina. Aumento de 200x. Fotos cedidas pelo Msc. Rodrigo Otávio Alves de Lima.

Entre os biomarcadores em nível morfológico da carcinogênese do cólon, destaca-se alterações estruturais da mucosa do cólon, denominadas criptas aberrantes (CAs). Em revisão recente, Cheng e Lai (2003) relatam que focos de criptas aberrantes (FCAs) são amplamente aceitos como lesões pré-neoplásicas da carcinogênese do cólon por apresentarem características histopatológicas, alterações bioquímicas e alterações genéticas e epigenéticas.

As criptas aberrantes foram descritas primeiramente por Bird (1987) em cólon de roedores tratados com azoximetano (AOM) (Tabela 2), metabólito da DMH. Posteriormente, Pretlow et al. (1991) identificaram no cólon de pacientes com adenocarcinoma focos de criptas aberrantes na mucosa adjacente às neoplasias.

As criptas aberrantes podem ser identificadas na mucosa do cólon, como únicas ou em forma de focos, sendo designados focos de criptas aberrantes (Figura 3) (TUDEK; BIRD; BRUCE, 1989). As criptas ou focos aberrantes são observados, com maior frequência, no cólon médio e distal tanto em roedores, como no homem (BONONI et al., 1999; DI GREGORIO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2002). Em roedores, as criptas aberrantes são induzidas por compostos químicos genotóxicos e não genotóxicos (BIRD, 1995; MCLELLAN; BIRD, 1988; WHITELEY; HUDSON; PRETLOW, 1996).

Acredita-se que as criptas aberrantes seja a expressão morfológica das alterações da proliferação e diferenciação celular que ocorrem devido a alterações da zona proliferativa das criptas durante o processo de carcinogênese do cólon. De fato, 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). Há trabalhos que demonstram que os índices de proliferação celular são maiores nos FCAs do que nas criptas da mucosa normal (POLYAK et al., 1996; SHPITZ et al., 1996). Foram observadas alterações genéticas nos FCAs, como mutações nos genes *K-ras*, *APC* e *P53*, relacionados à proliferação celular, e presença de instabilidade de microssatélites, um marcador de erros no sistema de reparo do DNA (HEINEN et al., 1996; JEN et al., 1994; NUCCI et al., 1997; SMITH et al., 1994).

Figura 3- Fotomicrografia de focos de criptas aberrantes (FCAs) em cólon de ratos. Identificados pela coloração de azul de metileno A (20x) e B por HE (corte histológico) (50x). Fotos cedidas pelo Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan.

Estudos recentes demonstraram que os FCAs com maior grau de displasia apresentam acúmulo citoplasmático e nuclear de β -catenina que é um marcador potencial de progressão neoplásica (YAMADA et al., 2000; 2003).

As substâncias químicas mais usadas para a indução da carcinogênese do cólon em animais, dimetilhidrazina e seu metabólito azoximetano, são considerados carcinógenos completos. No entanto, alguns trabalhos relatam que o ácido quenodesoxicólico (AQ), um ácido biliar, é capaz de potencializar a ação do carcinógeno atuando como promotor no processo carcinogênico por estimular a proliferação de criptas aberrantes na mucosa do cólon de ratos, previamente iniciadas com AOM (GHIA; MATTIOLI; MERETO, 1996; SUTHERLAND; BIRD, 1994).

I.4. FLORA BACTERIANA E METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

A microflora intestinal humana representa um rico ecossistema composto por microorganismos com ação metabólica, em contato direto com uma ampla superfície de absorção. Substratos podem entrar em contato com a flora bacteriana através da ingestão oral diretamente, ou pela secreção biliar após biotransformação hepática (GORBACH; GOLDIN, 1990).

Estima-se que a flora intestinal humana seja composta por mais de 400 espécies de bactérias, com predomínio dos organismos anaeróbios sobre os aeróbios da ordem de 1.000 para 1. Os principais componentes da flora anaeróbia são *Bacteróides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium* e *Peptostreptococcus* (SIMON; GORBACH, 1986). A maior população bacteriana está localizada no intestino grosso, onde a concentração bacteriana atinge cerca de 10^{11} a 10^{12} organismos/grama de fezes. As bactérias presentes no cólon caracterizam-se por realizar reações

enzimáticas de caráter redutivo. A tabela 3 contém uma lista de reações enzimáticas envolvendo bactérias intestinais, presentes nos mamíferos.

Tabela 3- Exemplo de reações bioquímicas realizadas por bactérias intestinais, presentes nos mamíferos (GORBACH; GOLDIN, 1990).

Reação	Substância representativa
<i>Hidrólise</i>	
Glicuronídeo	Estradiol 3-glicuronídeo
Glicosídeo	Cicasina
Éster	Acetildigoxina
Nitratos	Trinitrato de pentaeritritol
<i>Desidroxilação</i>	
C-hidroxi grupos	Ácidos biliares
N-hidroxi grupos	N-hidroxifluorenilacetamido
Descarboxilação	Amino ácidos
Desalogenação	Diclorodifeniltricloreto (DDT)
<i>Redução</i>	
Nitro grupos	Ácido <i>p</i> -nitrobenzóico
Azo grupos	Corantes
Formação de nitrosaminas	Dimetilnitrosamina
Acetilação	Histamina

Sabe-se que as bactérias da flora intestinal têm papel importante na biotransformação da uréia, da amônia e na produção de ácidos graxos de cadeia curta. Há evidências de que a flora bacteriana do intestino grosso pode transformar resíduos alimentares, ácidos biliares e outras substâncias presentes na luz intestinal em carcinógenos ou seus precursores (CHADWICK; GEORGE; CLAXTON, 1992).

Um exemplo clássico da atuação da flora bacteriana na geração de substâncias cancerígenas é a indução de câncer pela cicasina (metilazoximetanol- β -D-glicosídeo), encontrada no fruto da *Cycas cincinalis* (GOLDIN, 1986). A β -glicosidase, expressa pela flora bacteriana, é capaz de transformar metilazoximetanol- β -D-glicosídeo em metilazoximetanol, substância esta cancerígena. Administrada por gavagem a ratos convencionais, a cicasina leva ao desenvolvimento do câncer do cólon, o que não acontece se administrada a animais livres de patógenos (GOLDIN, 1986; LAQUER; MCDANIEL; MATSUMOTO, 1967). Por outro lado, a administração de antibióticos, interferindo na flora intestinal, suprime a ação cancerígena da dimetilhidrazina, também precursor do metilazoximetanol (GOLDIN; GORBACH, 1981). Estes resultados confirmam a participação da flora bacteriana na biotransformação de substâncias com potencial carcinógeno. Além da β -glicosidase, as bactérias intestinais expressam outras enzimas, como a nitrorredutase e a azorredutase, capazes também de produzir carcinógenos na luz do intestino grosso. Estas duas enzimas, como descrito anteriormente, apresentam função importante no metabolismo de corantes nitro-aminoazobenzenos (CHADWICK; GEORGE; CLAXTON, 1992).

A função das nitrorredutases na biotransformação e bioativação de compostos nitro aromáticos pela flora intestinal está bem estabelecida. A nitrorredução pode ocorrer pela transferência de um elétron, formando um ânion radical livre intermediário ou, por dois elétrons com a formação, nas duas vias, de amina como produto final da reação (GORBACH, 1982). Um exemplo da ação das nitrorredutases ocorre na biotransformação do 1-nitropireno (1-NP). Autores descreveram que 1-NP é reduzido

para 1-nitropireno seguido de subsequente redução para hidroxi-1-aminopireno e 1-aminopireno (1-AP) (Figura 4). Ambas, microflora intestinal de humanos e roedores, são capazes de reduzir 1-NP a 1-AP (CHADWICK; GEORGE; CLAXTON, 1992; HOWARD; BELAND; CERNIGLIA, 1983; MANNING; CERNIGLIA; FEDERLE, 1986).

Da mesma maneira, a ação de azorredutases sobre o grupamento azo está muito bem descrita na literatura como função exercida pelas bactérias intestinais. Como exemplo, temos a conversão dos seguintes diazo-corantes, Direct Black 38, Direct Red 2 e Direct Blue 15 (Tabela 1), nas respectivas aminas aromáticas, benzidina, 3,3-dimetilbenzidina e 3,3-dimetoxibenzidina (Tabela 1), substâncias estas de caráter mutagênico ou carcinogênico para bexiga (CERNIGLIA et al., 1986; GOLDIN, 1986; RAFII; FRANKLIN; CERNIGLIA, 1990).

Figura 4- Biotransformação do 1-nitropireno em 1-aminopireno. Modificado de CHADWICK; GEORGE; CLAXTON, 1992.

II. OBJETIVO

Considerando a atividade mutagênica do corante comercial CI Disperse Blue 291 atribuída a compostos eletrofílicos formados por nitrorredução e O-acetilação do composto parental, a capacidade de bactérias intestinais em participar destas reações e a contaminação da água por este composto; o objetivo do presente projeto foi avaliar o potencial genotóxico e o efeito indutor de focos de criptas aberrantes pelo corante comercial CI Disperse Blue 291 na mucosa do cólon de ratos Wistar machos, quando administrado por via intra-retal e por gavagem, respectivamente.

III- METODOLOGIA

III.1. ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (*Rattus norvegicus*, var. albino), com sete semanas de vida e peso inicial aproximado de 280g. Todos os animais utilizados no presente projeto foram provenientes do Biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo/SP. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno opacas, com tampa de aço inoxidável na forma de grade, forradas com maravalha previamente esterilizada, trocada rotineiramente em dias alternados. Cada caixa conteve no máximo cinco animais.

Os animais utilizados no protocolo experimental para o desenvolvimento do teste do cometa foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP/SP, enquanto aqueles utilizados para o teste dos focos de criptas aberrantes foram mantidos no Biotério do Conjunto das Químicas - USP/SP. Os animais foram submetidos a um período de aclimação de duas semanas.

Durante a fase de experimentação foram controladas as condições ambientais do biotério como: temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$) e período de 12/12 horas claro/escuro. Os animais receberam água e ração comercial Nuvilab-CR1 (Nuvital, PR) *ad libitum*, durante todo o experimento. O peso dos animais foi registrado com balança eletrônica (Marte), duas vezes por semana, durante todo o estudo.

Os protocolos utilizados neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/SP (Protocolo nº 32, aprovado em 05/04/2004) (Anexo 1).

III.2. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Corante comercial CI Disperse Blue 291 (DB291), CAS no. 56548-64-2, doado pela Clariant (Charlotte, NC, USA). 1,2-dimetilhidrazina (DMH), CAS no. 540-73-8, Tokyo Kasei Co. (Tóquio, Japão; DO 741 - lote FCX01). Ácido Quenodesoxicólico de Sódio (AQ), 97%, CAS no. 2646-38-0, e Ácido Etilenodiamino Tetraacético (EDTA), Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

III.3. DOSE ADMINISTRADA DO DB291

A busca por mimetizar uma possível exposição ambiental de forma contínua e por períodos prolongados, aliado a inexistência de informações sobre a toxicidade do corante comercial CI Disperse Blue 291 *in vivo*, resultou na padronização da dose de 50mg/kg de peso corpóreo. Experimentos prévios, realizados em nosso laboratório, demonstraram ausência de toxicidade aguda sistêmica em ratos que foram submetidos a tratamento com esta dose.

III.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

III.4.1. Teste do cometa

Após fase de aclimação, 15 animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais para realização do teste do cometa.

O DB291 foi diluído em água e administrado por via intra-retal (i.r.), empregando-se cânula de polipropileno (0,25cm x 4cm). Os animais receberam uma única dose de 50mg/kg e foram sacrificados 4 horas após administração, conforme descrito no protocolo experimental A (Figura 5).

O protocolo A foi constituído pelos seguintes grupos experimentais:

Grupo 1A – controle negativo

Constituído por 05 animais, que receberam uma única administração intra-retal de água na dose de 50mg/kg de peso corpóreo (p.c.).

Grupo 2A – controle positivo

Constituído por 05 animais, que receberam uma única administração subcutânea (s.c.) de 1,2-dimetilhidrazina (DMH) na dose de 40mg/kg p.c.

Grupo 3A – tratado

Constituído por 05 animais, que receberam uma única administração i.r. do corante DP291 na dose de 50mg/kg p.c.

Figura 5 – Protocolo experimental A

III.4.2. Teste dos focos de criptas aberrantes

Após fase de aclimação, 65 animais foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos experimentais no protocolo B, e em 6 grupos, no protocolo C.

O DB291 foi diluído em água e administrado por via intragástrica (i.g.), empregando-se cânula de aço inoxidável (0,2cm x 10cm). Os animais receberam 50mg/kg, três vezes por semana em dias alternados durante diferentes períodos, conforme descritos nos protocolos experimentais B e C, figuras 6 e 7, respectivamente.

O protocolo B foi constituído pelos seguintes grupos experimentais:

Grupos 1B e 2B

Foram constituídos por 05 animais cada, que receberam injeções subcutâneas de EDTA, veículo da DMH, 0,37mg/kg p.c., e DMH, 40mg/kg p.c., grupos 1B e 2B, respectivamente, duas vezes por semana durante as duas primeiras semanas. Os animais dos dois grupos receberam água, veículo do DB291, por gavagem e três vezes por semana em dias alternados, durante as oito primeiras semanas. Os grupos 1B e 2B foram os grupos controles negativo e positivo, respectivamente.

Grupos 3B e 4B

Foram constituídos por 05 animais cada, que receberam injeções s.c. de DMH, 40mg/kg p.c., duas vezes por semana durante as duas primeiras semanas. Os animais dos dois grupos receberam água durante as duas primeiras semanas e, entre a 3^a e a 8^a semana, o grupo 3B recebeu Ácido Quenodesoxicólico (AQ), enquanto o grupo 4B recebeu o corante CI Disperse Blue 291, ambos na dose de 50mg/kg p.c., por gavagem e três vezes por semana em dias alternados. Estes grupos foram controles positivos e tratados com AQ (3B) ou DB291 (4B), para avaliação do efeito promotor destes compostos.

Grupos 5B, 6B e 7B

Foram constituídos por 5 animais cada. Os animais dos três grupos, durante as duas primeiras semanas experimentais, receberam injeções s.c. de EDTA, 0,37mg/kg p.c., duas vezes por semana e o corante CI Disperse Blue 291, 50mg/kg p.c., por gavagem e três vezes por semana em dias alternados. Durante a 3^a e a 8^a semana, os animais do grupo 5B receberam AQ, enquanto os do grupo 6B receberam água e os animais do grupo 7B o corante Disperse Blue 291, todos na dose de 50mg/kg p.c., por

gavage e três vezes por semana em dias alternados. Estes grupos foram tratados com o DB291 para avaliar o efeito na iniciação da carcinogênese, grupo 5B e, como indutor de FCAs, grupos 6B e 7B.

Os animais pertencentes a este protocolo B foram sacrificados ao final da 12^a semana, permanecendo as quatro últimas semanas do experimento sem receber tratamento.

Figura 6 – Protocolo experimental B

O protocolo experimental C (Figura 7) foi constituído pelos grupos descritos abaixo:

Grupos 1C e 4C

Foram constituídos por 05 animais cada, que receberam injeções subcutâneas de EDTA, 0,37mg/kg de p.c., duas vezes por semana durante as duas primeiras semanas. Os grupos 1C e 4C receberam água por gavagem e três vezes por semana em dias alternados, durante as primeiras dezesseis e vinte e quatro semanas, respectivamente. Os animais foram sacrificados ao final da 20^a. e 28^a. semana de experimento, grupos 1C e 4C, respectivamente. Estes foram os grupos controles negativos.

Grupos 2C e 5C

Foram constituídos por 05 animais cada, que receberam injeções s.c. de DMH, 40mg/kg p.c., duas vezes por semana durante as duas primeiras semanas. Os grupos 2C e 5C receberam água por gavagem e três vezes por semana em dias alternados, durante as primeiras dezesseis e vinte e quatro semanas, respectivamente. Os animais foram sacrificados ao final da 20^a. e 28^a. semana de experimento, grupos 2C e 5C respectivamente. Estes foram os grupos controles positivos.

Grupos 3C e 6C

Foram constituídos por 05 animais cada, que receberam injeções s.c. de EDTA, 0,37mg/kg p.c., duas vezes por semana durante as duas primeiras semanas. Os grupos 3C e 6C receberam o corante CI Disperse Blue 291, 50mg/kg p.c., por gavagem e três vezes por semana em dias alternados, durante as primeiras dezesseis e vinte e quatro semanas, respectivamente. Os animais foram sacrificados ao final da 20^a. e 28^a.

semana de experimento, dos grupos 3C e 6C, respectivamente. Estes grupos foram tratados com o DB291 para avaliar o efeito na indução de FCAs.

Os animais pertencentes a este protocolo C não receberam nenhum tratamento durante as quatro últimas semanas experimentais.

Figura 7 – Protocolo experimental C

III.5. VIABILIDADE CELULAR E TESTE DO COMETA

Após a laparotomia, o cólon foi retirado, uma de suas extremidades amarrada com fio de algodão, e lavado com NaCl (0,9%) para remover as fezes. A outra extremidade foi também amarrada e, um “coquetel” de enzimas (colagenase I – 0,3mg

+ Tripsina/EDTA - 5mg) foi injetado no interior do cólon, O cólon foi então colocado em solução de Hanks, e mantido em banho-maria (37°C) por 40 minutos. Após esse período uma das extremidades foi cortada, e a suspensão de células coletada para análise da viabilidade celular e para a realização do teste do cometa.

A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o método de diacetato de fluoresceína/brometo de etídio descrito por Strauss (1991). Uma alíquota de 20µl da suspensão de células foi misturada a uma solução contendo 30µl de diacetato de fluoresceína em acetona (5mg/ml), 200µl de brometo de etídio em PBS (200µl/ml) e 4,8ml de PBS. As células foram analisadas em microscópio de fluorescência, e consideradas viáveis aquelas que metabolizaram o diacetato de fluoresceína e coraram-se em verde; as coradas em vermelho foram consideradas células mortas. Foram contadas 200 células por alíquota.

O ensaio de cometa foi conduzido de acordo com a metodologia descrita por Singh et al. (1988) e Valverde et al. (1997), e todas as etapas realizadas sob luz indireta. Uma alíquota de 10µl da suspensão de células foi misturada a 100µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), colocada sobre uma lâmina previamente recoberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (KLAUDE et al., 1996), coberta com uma lamínula e deixada a 4°C por 5 minutos para solidificar a agarose. Após esse período a lamínula foi cuidadosamente removida e a lâmina transferida para uma solução de lise (2,5M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% lauril sarcosinato de sódio, pH 10; Triton X-100 1% e DMSO 10%) por 24 horas. As lâminas foram então lavadas em PBS e colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese

preenchida com tampão alcalino (1mM EDTA e 300mM NaOH, pH 13). Após um período de 20 minutos, a eletroforese foi conduzida a 25V e 300mA por outros 20 minutos. As lâminas foram transferidas para uma solução de neutralização (0,4M Tris, pH 7,5), posteriormente desidratadas em etanol absoluto por 5 minutos e armazenadas até o momento da análise, quando foram coradas com 50µl brometo de etídio (20µg/ml). De cada animal foram examinados 50 nucleóides, em aumento de 200x, em microscópio de fluorescência (Olympus - BX60) acoplado a um sistema de análise de imagem (Comet II - Perspective Instruments, Inglaterra). Os parâmetros analisados foram: *tail intensity* (% de DNA na cauda do cometa) e *tail moment* (produto do DNA na cauda/ total de DNA a partir do centro de gravidade da cabeça do cometa).

III.6. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS ÓRGÃOS

O sacrifício dos animais foi realizado por injeção única intraperitoneal de pentobarbital sódico, após jejum de 24 horas. Após o sacrifício foi feita incisão na face ventral do animal ao longo da linha média, da região púbica até o processo xifóide. Os músculos do abdômen foram rebatidos lateralmente e, fígado, rins, bexiga e cólon distal de cada animal foram removidos. Os fígados e rins foram lavados com solução fisiológica (NaCl, 0,9%), para retirar excesso de sangue, pesados e, juntamente com as bexigas fixados em formalina 10% tamponada, durante 48 horas, para posterior inclusão em parafina. Posteriormente, cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise.

Os cólons, medindo aproximadamente 10 cm, foram lavados com NaCl para retirada das fezes. Após lavagem, foram abertos longitudinalmente e colocados em formalina, por 48 horas. Cada segmento foi corado com solução de azul de metileno 0,1% em PBS por 5 minutos e em seguida lavado com água deionizada, segundo procedimento descrito por Bird (1987). Os seguimentos foram colocados sobre lâminas de microscópio com a mucosa voltada para cima, para identificação e quantificação dos focos de criptas aberrantes. Fragmentos do cólon distal foram processados para obtenção de cortes histológicos que foram posteriormente corados com HE.

III.7. ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE FCAS

Os critérios utilizados para definição dos focos de criptas aberrantes foram aqueles descritos por Bird (1987): a) uma única cripta: a cripta aberrante é revestida por camada epitelial espessa, com abertura luminal geralmente elíptica e, tamanho pelo menos duas vezes superior ao das criptas normais circunvizinhas; b) foco com duas ou mais criptas: as criptas aberrantes, maiores que as criptas normais, formam blocos distintos e ocupam área maior que a ocupada por um número equivalente de criptas morfológicamente normais. Não há criptas de morfologia normal entre as criptas aberrantes dentro desses focos.

Os cólons foram examinados em microscópio óptico, no aumento de 100x, para a avaliação da frequência de focos de criptas aberrantes. Foram investigados 25 campos microscópicos semi-sucessivos, no segmento do cólon distal de cada animal e

calculado o número total de FCAs, o número total de CAs e a relação de CAs/FCAs. A análise foi dividida em focos com uma ou duas criptas aberrantes, focos com três ou quatro CAs e focos com cinco ou mais CAs.

III.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de todos os parâmetros analisados foram comparados entre os diferentes grupos experimentais utilizando-se o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, quando as comparações fossem significativamente diferentes. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV.1- OBSERVAÇÃO GERAL DOS ANIMAIS

Não houve mortalidade associada ao tratamento em nenhum dos grupos. No decorrer do experimento, todos os ratos pertencentes aos grupos tratados com o DB291 apresentaram manchas espaçadas de coloração azulada em regiões da cauda (Figura 8). Estas manchas indicam que o corante foi absorvido durante a passagem pelo trato gastrointestinal dos animais.

Figura 8- **A)** Manchas de coloração azulada em regiões da cauda de animal tratado com o corante comercial CI Disperse Blue 291. **B)** Comparação da cauda de animal tratado e não tratado com o DB291.

IV.2- PESO CORPÓREO

As tabelas 4 e 5 indicam os valores em média e desvio-padrão de peso corpóreo final e do ganho de peso corpóreo dos animais durante os diferentes períodos experimentais. No experimento de 12 semanas de duração, protocolo B, e de 20 e 28 semanas de duração, protocolo C, nenhuma diferença estatística foi constatada entre as médias dos pesos corpóreos finais e ganho de peso corpóreo dos diferentes grupos experimentais (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4- Peso corpóreo final e ganho de peso dos animais iniciados ou não com DMH, nos diferentes grupos tratados ou não com o corante comercial CI Disperse Blue 291, durante 12 semanas de experimento.

Grupos	Tratamento ^b	Peso corpóreo (g) ^a	
		Final	Ganho
1B	H ₂ O	443,0 ± 20,9	142,2 ± 21,5
2B	DMH	423,4 ± 17,7	114,2 ± 18,7
3B	DMH + AQ	413,6 ± 60,8	161,2 ± 50,4
4B	DMH + DB291	405,8 ± 30,2	154,0 ± 24,8
5B	DB291 + AQ	405,2 ± 20,0	155,0 ± 26,4
6B	DB291 + H ₂ O	424,6 ± 29,8	173,6 ± 23,7
7B	DB291	433,8 ± 24,9	132,2 ± 25,7

^a Valores expressos em média ± desvio-padrão. ^b DMH, 1,2-dimetilhidrazina; DB291, corante comercial CI Disperse Blue 291; AQ, ácido quenodesoxicólico.

Tabela 5- Peso corpóreo final e ganho de peso dos animais iniciados ou não com DMH, nos diferentes grupos tratados ou não com o corante comercial CI Disperse Blue 291, durante 20 ou 28 semanas de experimento.

Grupos	Tratamento ^b	Período (semanas)	Peso corpóreo (g) ^a	
			Final	Final
1C	H ₂ O	20	452,2 ± 23,7	161,0 ± 25,7
2C	DMH	20	443,8 ± 41,3	147,8 ± 41,4
3C	DB291	20	461,6 ± 28,2	166,4 ± 27,2
4C	H ₂ O	28	425,0 ± 20,8	154,6 ± 19,6
5C	DMH	28	455,8 ± 34,5	168,8 ± 37,9
6C	DB291	28	437,8 ± 23,5	158,8 ± 23,4

^a Valores expressos em média ± desvio-padrão. ^b DMH, 1,2-dimetilhidrazina; DB291, corante comercial CI Disperse Blue 291.

A figura 9 A, B e C apresenta os dados da evolução de peso corpóreo médio dos animais durante os períodos de 12, 20 e 28 semanas experimentais, respectivamente. Os animais pertencentes aos grupos tratados ou não com o corante comercial CI Disperse Blue 291 apresentaram evolução de peso corpóreo médio semelhantes, independente da iniciação ou não com a 1,2-dimetilhidrazina.

Figura 9- Evolução de peso corpóreo médio dos animais dos diferentes grupos experimentais. Períodos experimentais: **A)** 12 semanas; **B)** 20 semanas; **C)** 28 semanas.

IV.3- PESO RELATIVO DE FÍGADO E RINS

As tabelas 6 e 7 indicam os valores em média e desvio-padrão de peso relativo de fígado e rins dos animais durante os diferentes períodos experimentais. Nenhuma diferença estatística foi constatada entre as médias dos pesos relativos de fígado e rins dos animais pertencentes aos grupos tratados, nos três períodos experimentais estabelecidos.

Tabela 6- Peso corpóreo final e peso relativo de fígado e rins dos animais iniciados ou não com DMH, nos diferentes grupos tratados ou não com o corante comercial CI Disperse Blue 291, durante 12 semanas de experimento.

Grupos	Tratamento ^b	Peso corpóreo final (g)	Peso relativo ^c (%)	
			Fígado	Rins
1B	H ₂ O	443,0 ± 20,9	2,4 ± 0,2	0,6 ± 0,06
2B	DMH	423,4 ± 17,7	2,4 ± 0,3	0,6 ± 0,03
3B	DMH + AQ	413,6 ± 60,8	2,8 ± 0,1	0,6 ± 0,05
4B	DMH + DB291	405,8 ± 30,2	3,0 ± 0,1	0,6 ± 0,05
5B	DB291 + AQ	405,2 ± 20,0	3,1 ± 0,3	0,6 ± 0,04
6B	DB291 + H ₂ O	424,6 ± 29,8	3,0 ± 0,2	0,6 ± 0,07
7B	DB291	433,8 ± 24,9	2,6 ± 0,3	0,6 ± 0,03

^a Valores expressos em média ± desvio-padrão. ^b DMH, 1,2-dimetilhidrazina; DB291, corante comercial CI Disperse Blue 291; AQ, ácido quenodesoxicólico. ^c Peso relativo = peso do órgão/ peso final do animal.

Tabela 7- Peso corpóreo final e peso relativo de fígado e rins dos animais iniciados ou não com DMH, nos diferentes grupos tratados ou não com o corante comercial CI Disperse Blue 291, durante 20 ou 28 semanas de experimento.

Grupos	Tratamento ^b	Período (semanas)	Peso corpóreo final (g)	Peso relativo ^c (%)	
				Fígado	Rins
1C	H ₂ O	20	452,2 ± 23,7	2,3 ± 0,1	0,5 ± 0,06
2C	DMH	20	443,8 ± 41,3	2,1 ± 0,2	0,5 ± 0,03
3C	DB291	20	461,6 ± 28,2	2,5 ± 0,5	0,5 ± 0,08
4C	H ₂ O	28	425,0 ± 20,8	2,9 ± 0,4	0,6 ± 0,05
5C	DMH	28	455,8 ± 34,5	2,4 ± 0,1	0,5 ± 0,02
6C	DB291	28	437,8 ± 23,5	2,6 ± 0,2	0,5 ± 0,04

^a Valores expressos em média ± desvio-padrão. ^b DMH, 1,2-dimetilhidrazina; DB291, corante comercial CI Disperse Blue 291. ^c Peso relativo = peso do órgão/ peso final do animal.

IV.4- TESTE DO COMETA

A Tabela 8 mostra os resultados do teste do cometa. O teste de viabilidade mostrou que as suspensões celulares obtidas dos cólons apresentavam mais de 75% de células viáveis. O resultado referente ao *tail moment* (quantidade de DNA na cauda X comprimento da cauda) foi maior para o grupo tratado com o DP291 (3A) quando comparado com o grupo controle negativo (1A), indicando que o corante causou lesão no DNA das células da mucosa do cólon dos ratos. Não foi observada diferença estatística para *tail intensity* (% de DNA na cauda do cometa) entre os grupos 3A (DB291) e 1A (água).

Tabela 8- Danos no DNA (*tail moment* e *tail intensity*) de células do cólon de ratos Wistar no diferentes tratamentos^a.

Grupos	Tratamento ^b	Número de animais	Danos no DNA		Viabilidade celular (%)
			<i>Tail Moment</i>	<i>Tail Intensity</i>	
1A	H ₂ O	5	14,9 ± 0,6	45,5 ± 1,1	83,8 ± 2,8
2A	DMH	5	19,3 ± 0,7*	52,9 ± 1,5**	77,3 ± 1,3
3A	DB291	5	17,3 ± 0,7*	44,2 ± 1,1	78,3 ± 1,7

^a Valores expressos em média ± desvio-padrão. ^b DMH, 1,2-dimetilhidrazina; DB291, corante comercial Disperse Blue 291. *p < 0,05 (comparado com o grupo tratado com H₂O); **p < 0,001 (comparado com o grupo tratado com H₂O e DB291).

IV.5- ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após 12, 20 e 28 semanas de experimentação não foram observadas alterações dignas de nota nos cortes histológicos de bexiga, fígado e rins dos animais iniciados ou não com a DMH e tratados ou não com o corante comercial CI Disperse Blue 291, como também, no cólon dos animais não iniciados com o carcinógeno DMH (Figura 10A). Somente os animais iniciados com a DMH, independente do tratamento com o DB291, apresentaram focos de criptas aberrantes na mucosa do cólon distal (Figura 10B). Constatou-se a presença de um adenocarcinoma na mucosa de um animal que foi somente iniciado com a DMH e sacrificado após 28 semanas (Figura 11).

Figura 10- Fotomicrografia da mucosa de cólon de ratos. **A)** Animal sem nenhum tratamento (grupo 4C). **B)** Animal tratado com DMH mostrando foco de criptas aberrantes (grupo 5C). Coloração HE, aumento 40x.

IV.6- ANÁLISE QUANTITATIVA DE FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES

As tabelas 9, 10, 11, 12 e 13 apresentam os resultados referentes ao número total de focos de criptas aberrantes (FCAs) e de criptas aberrantes (CAs) e o número de CAs/FCAs encontrados na mucosa do cólon distal de ratos nos diferentes períodos experimentais.

Os dados de focos de criptas aberrantes referentes aos experimentos com 12, 20 e 28 semanas de duração, estão representados nas tabelas 9, 10 e 11, respectivamente. Todos os animais pertencentes aos grupos que não foram iniciados com o carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina não apresentaram FCAs na mucosa de seus cólons (Figura 12A). Todos os animais pertencentes aos grupos controles positivos, iniciados com a DMH, apresentaram FCAs na mucosa de seus cólons, nos diferentes períodos experimentais (Figura 12B).

Nenhuma diferença estatística significativa foi observada para os resultados de número e multiplicidade de focos de criptas aberrantes entre 03 grupos controles positivos, 2B, 3B e 4B que foram iniciados com a DMH e receberam água, ácido quenodesoxicólico e o corante comercial CI Disperse Blue 291, respectivamente, durante a terceira e a oitava semana de experimento (Tabela 12). Também não foi constatada diferença estatística para a quantificação de FCAs entre os grupos 2B, 2C e 5C que foram iniciados com a DMH e receberam somente água durante 12, 20 e 28 semanas, respectivamente (Tabela 13).

Figura 11- Aspecto macroscópico (A) e microscópico (aumento 40x) (B) de mucosa de cólon de rato, após 28 semanas da iniciação com DMH, mostrando presença de adenocarcinoma (grupo 5C).

Figura 12- Fotomicrografia da mucosa de cólon de ratos. **A)** Animal sem nenhum tratamento (grupo 4C). **B)** Animal tratado com DMH mostrando FCAs (grupo 5C). Coloração azul de metileno, aumento 40x.

Tabela 9- Número e multiplicidade de focos de criptas aberrantes na mucosa do cólon de ratos durante experimento de 12 semanas^a.

Grupos	Tratamento ^b	Número de criptas aberrantes/ FCAs ^c			Número total de CAs ^d	Número total de FCAs	Criptas/ FCAs
		1 e/ou 2 criptas	3 e/ou 4 criptas	5 ou + criptas			
1B	H ₂ O	0	0	0	0	0	0
2B	DMH	18 ± 5,1*	10 ± 3,5*	5 ± 2,6*	70 ± 22,7*	32 ± 9,7*	2,16 ± 0,2*
3B	DMH + AQ	21 ± 7,6*	13 ± 5,7*	2 ± 1,0*	68 ± 23,7*	36 ± 11,7*	1,92 ± 0,3*
4B	DMH + DB291	27 ± 14,1*	12 ± 5,3*	3 ± 2,2*	78 ± 29,0*	42 ± 17,5*	1,90 ± 0,4*
5B	DB291 + AQ	0	0	0	0	0	0
6B	DB291 + H ₂ O	0	0	0	0	0	0
7B	DB291	0	0	0	0	0	0

^a Valores expressos em média ± desvio-padrão. ^b DMH, 1,2-dimetilhidrazina; AQ, Ácido Quenodesoxicólico; DB291, corante comercial CI Disperse Blue 291. ^c FCAs, foco de criptas aberrantes. ^d ACs, criptas aberrantes. * p < 0,05 (comparados com os grupos 1B, 5B, 6B e 7B).

Tabela 10- Número e multiplicidade de focos de criptas aberrantes na mucosa do cólon de ratos durante experimento de 20 semanas^a.

Grupos	Tratamento ^b	Número de criptas aberrantes/ FCAs ^c				Número total de CAs ^d	Número total de FCAs	Criptas/ FCAs
		1 e/ou 2 criptas	3 e/ou 4 criptas	5 ou + criptas				
1C	H ₂ O	0	0	0		0	0	0
2C	DMH	12 ± 4,0*	10 ± 1,3*	9 ± 6,2*		91 ± 37,2*	34 ± 10,4*	2,63 ± 0,5*
3C	DB291	0	0	0		0	0	0

^a Valores expressos em média ± desvio-padrão. ^b DMH, 1,2-dimetilhidrazina; DB291, corante comercial CI Disperse Blue 291. ^c FCAs, foco de criptas aberrantes. ^d ACs, criptas aberrantes. * p < 0,05 (comparados com os grupos 1C e 3C).

Tabela 11- Número e multiplicidade de focos de criptas aberrantes na mucosa do cólon de ratos durante experimento de 28 semanas^a.

Grupos	Tratamento ^b	Número de criptas aberrantes/ FCAs ^c				Número total de CAs ^d	Número total de FCAs	Criptas/ FCAs
		1 e/ou 2 criptas	3 e/ou 4 criptas	5 ou + criptas				
4C	H ₂ O	0	0	0		0	0	0
5C	DMH	14 ± 4,8*	12 ± 6,3*	10 ± 6,6*		102 ± 47,1*	37 ± 12,6*	2,67 ± 0,6*
6C	DB291	0	0	0		0	0	0

^a Valores expressos em média ± desvio-padrão. ^b DMH, 1,2-dimetilhidrazina; DB291, corante comercial CI Disperse Blue 291. ^c FCAs, foco de criptas aberrantes. ^d ACs, criptas aberrantes. * p < 0,05 (comparados com os grupos 4C e 6C).

Tabela 12- Efeito do ácido quenodesoxicólico e do corante comercial CI Disperse Blue 291 na promoção de focos de criptas aberrantes induzidos pela 1,2-dimetilhidrazina, durante 12 semanas de experimento^a.

Grupos	Tratamento ^b	Número de criptas aberrantes/ FCAs ^c				Número total de CAs ^d	Número total de FCAs	Criptas/ FCAs
		1 e/ou 2 criptas	3 e/ou 4 criptas	5 ou + criptas				
2B	DMH	18 ± 5,1	10 ± 3,5	5 ± 2,6	70 ± 22,7	32 ± 9,7	2,16 ± 0,2	
3B	DMH + AQ	21 ± 7,6	13 ± 5,7	2 ± 1,0	68 ± 23,7	36 ± 11,7	1,92 ± 0,3	
4B	DMH + DB291	27 ± 14,1	12 ± 5,3	3 ± 2,2	78 ± 29,0	42 ± 17,5	1,90 ± 0,4	

^a Valores expressos em média ± desvio-padrão. ^b DMH, 1,2-dimetilhidrazina; AQ, Ácido Quenodesoxicólico; DB291, corante comercial CI Disperse Blue 291. ^c FCAs, foco de criptas aberrantes. ^d ACs, criptas aberrantes.

Tabela 13- Quantificação de focos de criptas aberrantes nos grupos induzidos pela 1,2-dimetilhidrazina, nos três períodos em estudo^a.

Grupos	Período (semanas)	Número de criptas aberrantes/ FCAs ^b				Número total de CAs ^d	Número total de FCAs	Criptas/ FCAs
		1 e/ou 2 criptas	3 e/ou 4 criptas	5 ou + criptas				
2B	12	18 ± 5,1	10 ± 3,5	5 ± 2,6	70 ± 22,7	32 ± 9,7	2,16 ± 0,2	
2C	20	12 ± 4,0	10 ± 1,3	9 ± 6,2	91 ± 37,2	34 ± 10,4	2,63 ± 0,5	
5C	28	14 ± 4,8	12 ± 6,3	10 ± 6,6	102 ± 47,1	37 ± 12,6	2,67 ± 0,6	

^a Valores expressos em média ± desvio-padrão. ^b FCAs, foco de criptas aberrantes. ^c ACs, criptas aberrantes.

V. DISCUSSÃO

Azo-corantes dispersos são usados largamente pelas indústrias têxteis para o tingimento de poliéster e podem ser encontrados em ambientes aquáticos oriundos da descarga de efluentes industriais podendo levar a exposição de humanos por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados (UMBUZEIRO et al., 2005a). O corante comercial CI Disperse Blue 291 é um exemplo de azo-corante disperso bastante utilizado pelas indústrias de tingimento. Este produto apresentou atividade mutagênica para linhagens de *Salmonella typhimurium* que super expressam nitrorredutase e/ou O-acetiltransferase indicando um importante papel dessas enzimas na ativação deste composto (UMBUZEIRO et al., 2005b). Considerando a habilidade das bactérias da flora intestinal dos mamíferos na expressão destas enzimas (CHADWICK; GEORGE; CLAXTON, 1992; HICKMAN, 1998) e a sua reconhecida atuação na biotransformação de substâncias presentes na luz intestinal (CHADWICK; GEORGE; CLAXTON, 1992; GORBACH; GOLDIN, 1990), sugerimos que o intestino possa ser um importante órgão-alvo da ação do DB291 após sua biotransformação por bactérias intestinais.

Dentre os inúmeros modelos experimentais usados para o estudo do processo de carcinogênese do cólon destacam-se, em ensaios *in vivo*, os que utilizam agentes químicos para indução de lesões pré-neoplásicas na mucosa de roedores (BANERJEE; QUIRKE, 1998). Estas lesões são alterações que precedem o aparecimento da neoplasia e estão associadas a estágios iniciais do processo de carcinogênese, podendo ser identificadas em nível molecular, celular ou morfológico (ITO et al., 1998; LIPPMAN et al., 1990; PEREIRA et al., 1994; WARD; HENDERSON, 1996). O teste do

cometa e a identificação de focos de criptas aberrantes são ensaios bastante utilizados para avaliação de alterações moleculares e morfológicas, respectivamente, na mucosa do cólon de roedores (CHENG; LAI, 2003; OSTLING; JOHANSON, 1984; SASAKI et al., 2000; SHPITZ et al., 1996).

Considerando a atividade mutagênica do corante comercial CI Disperse Blue 291 atribuída a compostos eletrofílicos formados por nitrorredução e O-acetilação do composto parental e a capacidade de bactérias intestinais em participar destas reações, propôs-se avaliar o potencial do corante DB291 no desenvolvimento de lesões genotóxicas e focos de criptas aberrantes na mucosa do cólon de ratos Wistar machos, quando administrado por via intra-retal e por gavagem, respectivamente.

O tratamento dos ratos com o corante comercial CI Disperse Blue 291, na dose de 50mg/kg p.c., por gavagem, três vezes por semana em dias alternados e durante 02, 08, 16 e 24 semanas de experimento, não alterou a evolução de peso, a média final do peso corpóreo e os pesos relativos de fígados e rins dos animais. A análise histológica não demonstrou alterações dignas de nota para bexiga, cólon, fígado e rins dos animais tratados com o DB291. Estes resultados sugerem que o corante apresenta baixa toxicidade crônica para roedores, nas condições testadas.

Os resultados com o teste do cometa indicaram que o corante comercial CI Disperse Blue 291 apresenta atividade genotóxica para células da mucosa do cólon de ratos. Após uma única administração intra-retal do corante, na dose de 50 mg/kg p.c., observou-se que os valores referentes ao *tail moment* (quantidade de DNA na cauda X comprimento da cauda) foram maiores para o grupo tratado com o DP291 quando comparado com o grupo controle, tratado somente com água, indicando que o corante

causou lesão no DNA das células da mucosa do cólon dos roedores. Os valores obtidos para *tail intensity* (% de DNA na cauda do cometa) não apresentaram diferença entre o grupo tratado com o DB291 e o controle, indicando que o dano causado pelo corante pode ter gerado fragmentos de DNA grandes de difícil arraste na eletroforese, fato que pode ter diminuído a quantidade de DNA presente na cauda.

Em relação à formação de criptas aberrantes, os ratos tratados por gavagem com o corante comercial CI Disperse Blue 291, na dose de 50mg/kg p.c., três vezes por semana em dias alternados e durante 02, 08, 16 e 24 semanas de experimento, não desenvolveram focos de criptas aberrantes na mucosa do cólon.

Os resultados obtidos com o teste do cometa demonstram que o DB291 é capaz de provocar danos iniciais ao material genético das células da mucosa do cólon de ratos, enquanto que os resultados com o teste de focos de criptas aberrantes sugerem que o corante, nas condições testadas, não apresenta potencial para desenvolver lesões pré-neoplásicas mais tardias dentro processo de carcinogênese de cólon em roedores. Fatores relacionados às células do cólon como sistema de reparo de danos ao DNA e genes supressores tumorais, ou ainda, relacionados ao corante e ao tratamento como dose, tempo de exposição, biotransformação e biodisponibilidade do corante na luz intestinal podem ser responsáveis por estes resultados.

O corante comercial CI Disperse Blue 291 possui agentes dispersantes formados por extensas cadeias carbônicas aderidas a sua molécula cromófora, no entanto, nada se sabe a respeito da constituição desses dispersantes e de como se interagem com a molécula cromófora do corante (GUARATINI; ZANONI, 2000). Este fato aliado à inexistência de informações sobre as possíveis etapas de biotransformação do corante,

torna difícil elucidar a cinética do DB291 no organismo, como também, mensurar a biodisponibilidade da molécula cromófora do DB291 na luz intestinal dos ratos tratados. No presente projeto, observamos que durante o experimento, os ratos tratados com o DB291 apresentaram coloração azulada em algumas regiões da cauda, indicando que o corante foi absorvido. Devido à extensa cadeia que constitui os agentes dispersantes, podemos afirmar que a molécula cromófora do DB291 foi absorvida pelo trato gastrointestinal e observada na região caudal dos animais.

A estrutura química do corante comercial CI Disperse Blue 291 requer biotransformação para formar metabólitos eletrofílicos capazes de reagir com o material genético e causar danos às células. A complexidade da molécula do corante em estudo gerou inúmeras hipóteses de biotransformação de acordo com os grupamentos químicos presentes na mesma.

Os grupamentos nitro (NO_2) podem ser reduzidos a hidroxilaminas, pela ação das nitrorredutases presentes na flora intestinal. Os radicais hidroxilaminas formariam grupamentos instáveis por ação de *N*-acetiltransferases (NATs) e, em seguida, gerariam compostos eletrofílicos capazes de reagir com o DNA; ou ainda, os radicais hidroxilaminas poderiam sofrer *N*-acetilação e posterior *O*-acetilação formando grupamentos instáveis que também são capazes de gerar compostos eletrofílicos. Caso os grupamentos nitro forem completamente reduzidos a aminas aromáticas, estas podem sofrer *N*-acetilação, serem absorvidas e sofrer posterior *N*-oxidação, por enzimas do sistema citocromo P450 presentes nas células da mucosa do cólon, sendo CYP3A a isoforma mais abundante, ou no fígado (DING; KAMINSKY, 2003). Os compostos formados poderiam sofrer ação de *O*-acetiltransferases ou *N,O*-

acetiltransferases formando grupamentos instáveis que gerariam íons eletrofílicos, como o íon nitrênio ou carbaníon, capazes de reagir com DNA formando adutos (ARLT et al., 2005; UMBUZEIRO et al., 2005b).

O grupamento azo ($N=N$) pode ser reduzido à aminas aromáticas por ação das enzimas azorredutases, expressas pelas bactérias da flora intestinal (CHADWICK; GEORGE; CLAXTON, 1992). Estas podem sofrer *N*-acetilação e posterior *N*-oxidação, por enzimas do sistema citocromo P450 e ainda, por ação de *O*-acetiltransferases ou *N,O*-acetiltransferases formar grupamentos instáveis que gerariam íons eletrofílicos, como descrito no parágrafo anterior (ARLT et al., 2005).

O grupamento acetanilida ($NHCOCH_3$) pode, por *N*-oxidação catalizada por enzimas do sistema citocromo P450 presentes nas células da mucosa do cólon ou no fígado, e posterior *O*-acetilação formar grupamentos instáveis que podem resultar em compostos eletrofílicos que reagiriam com o DNA (ARLT et al., 2005).

Enzimas do sistema citocromo P450 podem promover *N*-desacetilação e posterior *N*-oxidação de grupamentos dietilamina [$N(CH_2CH_3)_2$]. Estes compostos por *O*-acetilação resultariam em compostos instáveis que são capazes de gerar íons eletrofílicos (ARLT et al., 2005).

Outra via de formação de compostos passíveis de reação com DNA seria a dehalogenação oxidativa ou redutiva (SONO et al., 1996; SUBACH et al., 2006), pelo citocromo P450 presente nas células da mucosa do cólon ou no fígado, formando um epóxido e um composto eletrofílico, respectivamente.

O grupamento metoxi (OCH₃) poderia sofrer O-demetilação, por enzimas do sistema citocromo P450, formando grupamentos instáveis que gerariam íons eletrofílicos capazes de reagir com DNA celular (DAUTERMAN, 1994).

Os experimentos deste trabalho que avaliaram o desenvolvimento de focos de criptas aberrantes tiveram o intuito de mimetizar uma possível exposição ambiental de forma contínua e por períodos prolongados do corante, resultando deste modo na padronização da dose de 50 mg/kg p.c., sendo administrada três vezes por semana em dias alternados e durante períodos com até 24 semanas de tratamento. Esta dose e tempo de exposição demonstraram ser insuficientes para induzir o desenvolvimento destas lesões pré-neoplásicas no cólon de animais. Trabalhos mostraram que mesmo a administração de 1,2-dimetilhidrazina, conhecido agente alquilante de DNA e carcinógeno completo de cólon, quando realizada a baixas doses, com intervalo de dias entre as administrações e por longos períodos também não induz a formação de tumores no cólon de animais, enquanto doses mais elevadas e administrações mais freqüentes foram capazes de induzir (GLAUERT & WEEKS, 1989; JACKSON et al, 1999). Segundo alguns autores, um sistema de reparo de danos ao DNA bastante eficiente é a justificativa para a não promoção da lesão inicial gerada pela administração da DMH nas células da mucosa intestinal de animais (COLUSSI et al., 2001), podendo ser este sistema uma vez mais e, de forma semelhante, responsável pelo não desenvolvimento de possíveis danos gerados pelo DB291 e seus metabólitos nas doses e condições avaliadas neste trabalho.

Estudo realizado em linhagens de células de hepatoma humano, HepG2, mostrou que o corante comercial CI Disperse Blue 291 possui atividade genotóxica e

mutagência para estas células (TSUBOY et al., 2006). Este dado indica que o corante apresenta possível atividade tóxica para o fígado, que poderia estar ocorrendo durante sua passagem ou de seus metabólitos por este órgão e também, após biotransformação realizada pelas enzimas hepáticas, conforme discutido anteriormente. UMBUZEIRO et al., (2005b) demonstrou aumento da mutagenicidade na presença da fração S9 para as linhagens TA98NR, TA98, YG1021, TA98DNP6 e YG1024 de *Salmonella typhimurium* indicando uma importante participação do citocromo P450 na ativação deste corante. A biotransformação hepática dos radicais $-OCH_3$, $-N(CH_2CH_3)_2$ e $-Br$, gerando intermediários genotóxicos, pode estar relacionada a estes resultados. Estes dados sugerem o fígado e também a bexiga, envolvida na excreção de metabólitos eletrofílicos formados, sejam importantes órgãos-alvo do DB291.

A USEPA realizou ensaios com a molécula cromófora do azo-corante CI Disperse Blue 79:1, a qual apresenta grande semelhança estrutural com a molécula do DB291. O DB79:1 foi administrado via oral a ratos em doses que variaram de 50 a 500 mg/kg de p.c. e, avaliado para ensaios de toxicidade aguda e crônica, teratogenicidade, mutagenicidade e ecotoxicidade apresentando grande aceitabilidade para estes parâmetros avaliados, sendo negativo para a grande maioria deles. Ensaios de cinética demonstraram que mais de 90% do corante administrado percorreu o trato gastrointestinal dos animais e foi eliminado; a pequena parte absorvida foi eliminada na urina sem sofrer biotransformação (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006b). Estes resultados sugerem que a molécula cromófora do DB291, apesar de absorvida, não tenha sofrido biotransformação no colon dos ratos tratadas nas condições experimentais estudadas.

Considerando os níveis de 8-oxo-2'-desoxiguanosina, um marcador de dano oxidativo ao DNA, nos fígado dos mesmos animais utilizados neste trabalho - tratados com o corante comercial CI Disperse Blue 291, nas dose de 50mg/kg p.c., três vezes por semana em dias alternados, durante 8 e 16 semanas - foram menores nos grupos tratados quando comparados com os controles negativos, indicando que a presença do DB291 poderia ter reduzido a geração de radicais livres (VICTÓRIO et al., 2005) ou que os radicais livres presentes normalmente nas células teriam reagido com a molécula do corante DP291, diminuindo consequentemente a formação dos radicais 8 oxodGuo. Os danos causados no DNA pelo DP291 não seriam do tipo adutos de 8 oxoGuo. Investigações sobre os tipos de lesões causadas no DNA pelo DP291 e seus metabólitos seriam necessárias para elucidar essa questão.

A utilização de focos de criptas aberrantes como biomarcadores precoces do desenvolvimento do câncer de cólon tem sido bastante discutida. O conflito de resultados entre trabalhos que observaram e não observaram uma correlação entre a ocorrência de FCAs e cânceres de cólon, indicam que avaliar separadamente apenas o número e tamanho de FCAs não consiste em um ensaio confiável (WIJNANDS et al., 2004).

Alguns autores relatam a participação de ácidos biliares na etapa de promoção da carcinogênese de cólon (POWELL et al., 2001; SUTHERLAND; BIRD, 1994; VAN DER MEER et al., 1997). Ratos iniciados com carcinógeno azoximetano e tratados com dieta diária contendo 0,1% de ácido quenodesoxicólico, durante 02 ou 06 semanas, apresentaram aumento no número de focos de criptas aberrantes na mucosa do cólon quando comparados com ratos que também foram iniciados com AOM e tratados com

ração basal, indicando que o AQ possui atividade promotora no processo de carcinogênese química de cólon em ratos (GHIA et al., 1996; SUTHERLAND; BIRD, 1994). Entretanto, nossos resultados não verificaram a propriedade promotora deste ácido biliar. Ratos iniciados com DMH e tratados por gavage durante 06 semanas com o ácido quenodesoxicólico, na dose de 50 mg/kg p.c., e três vezes por semana em dias alternados, não apresentaram diferença significativa para o número e multiplicidade de FCAs quando comparados com ratos somente iniciados com DMH e tratados com água nas mesmas condições experimentais. Este resultado pode ter ocorrido porque a dose administrada de AQ foi aproximadamente três vezes menor que a relatada na literatura ou pela administração ter acontecido em dias alternados. A não constatação do efeito promotor do AQ nas condições experimentais utilizadas impossibilitou avaliar com segurança o potencial do corante comercial CI Disperse Blue 291 na promoção de lesões pré-neoplásicas na mucosa de ratos, previamente iniciados com a DMH.

Nenhuma diferença estatística foi observada entre períodos experimentais de 12, 20 e 28 semanas, quanto à multiplicidade de focos de criptas aberrantes presentes na mucosa do cólon distal de ratos iniciados com DMH, indicando que testes com protocolos mais curtos, 12 semanas, são tão eficientes quanto os de protocolos mais longos, 28 semanas. Tratando-se da identificação de possíveis carcinógenos humanos, estes resultados apóiam a tendência de se utilizar dados de testes de carcinogênese química de curta duração, em substituição aos tradicionais ensaios de 2 anos em roedores, que apresentam alto custo e são de execução laboriosa (COHEN, 2001).

Este foi o primeiro estudo usando o produto comercial de um corante-azo disperso que tentou estabelecer uma correlação entre uma resposta mutagênica

positiva para linhagens de *Salmonella* que expressam altas concentrações de nitrorredutase e O-acetiltransferase e o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na mucosa do cólon de ratos através da ativação do composto pela flora intestinal, que também expressa essas enzimas. Pode-se observar que o produto comercial DP291, nas condições testadas foi capaz de induzir lesões de DNA na mucosa dos ratos tratados, porém não causou aumento na indução de criptas aberrantes. Considerando que o DP291 causou danos em células de fígado humano (HepG2) alta atividade mutagênica no teste Salmonella microssoma os resultados apontam para necessidade de realização de testes de carcinogênese de longa duração para avaliação segura do seu potencial carcinogênico, não somente em cólon, mas em outros órgãos tais como fígado e bexiga.

VI. CONCLUSÕES

Ratos tratados por gavagem com o corante comercial CI Disperse Blue 291, na dose de 50mg/kg p.c., três vezes por semana em dias alternados e durante 02, 08, 16 e 24 semanas de experimento, não desenvolveram focos de criptas aberrantes na mucosa do cólon.

Entretanto, uma única administração intra-retal do corante, na dose de 50mg/kg p.c., demonstrou que o corante causou lesão no DNA das células da mucosa do cólon dos roedores, indicando atividade genotóxica.

VII. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA ÍNDUSTRIA QUÍMICA. **Atividades setoriais – Corantes e pigmentos**. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/corantes/cor.asp>>.

Acesso em: 05 nov. 2005.

ANLIKER, R. Ecotoxicology of dyestuffs – a join effort by industry. **Ecotox. Environ. Safe.**, New York, v. 3, p. 59-74, 1979.

ARLT, V.M., SCHMEISER, H.H., OSBORNE, M.R., KAWANISHI, M., KANNO, T., YAGI, T., PHILLIPS, D.H., TAKAMURA-ENYA, T. Identification of three major adducts formed by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in the rat lung at the C8 and N² position of the guanine and at the N⁶ position of adenine. **Inter. J. Cancer**, New York, On line: 05/12/2005. *in press*

ARSLAN, I., BALCIOGLU, I.A., TUHKANEN, T. Oxidative treatment of simulated dyehouse effluent by UV and near-UV Light assisted Fenton's reagent. **Chemosphere**, Oxford, v. 39 (15), p. 2767-2783, 1999.

BANERJEE, A., QUIRKE, P. Experimental models of colorectal cancer. **Dis. Colon Rectum**, Philadelphia, v. 41, p. 490-505, 1998.

BECHTOLD, T.; TURCANU, A.; GANGLBERGER, E.; GEISLER, S.J. Natural dyes in modern textile dyehouses – how to combine experiences of two centuries to meet the demands of the future? **J. Cleaner Produc.**, Amsterdam, v. 11, p. 499-509, 2003.

BIRD, R.P. Observation and qualification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Lett.**, Virginia, v. 37, p. 147-151, 1987.

BIRD, R.P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Lett.**, Virginia, V. 93, p. 55-71, 1995.

BONONI, A.P.; CAETANO, C.S., ROCHA, N.S., OLIVEIRA, S.V., SALVADORI, D.M.F., CAMARGO, J.L.V. Lesões da bexiga e do cólon de ratos Wistar submetidos à carcinogênese química de duas etapas. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 45:(4), p. 13-24, 1999.

CERNIGLIA, C.E., ZHUO, Z., MANNING, B.W., FEDERLE, T.W., HEFLICH, R.H. Mutagenic activation of the benzidine-based dye Direct Black by human intestinal microflora. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 175, p. 11-16, 1986.

CHADWICK, R.W., GEORGE, S.E., CLAXTON, L.D. Role of gastrointestinal mucosa and microflora in the bioactivation of dietary and environmental mutagens or carcinogens. **Drug Metabol. Rev.**, New York, v. 24, p. 425-492, 1992.

CHENG, L., LAI, M. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. **World J. Gastroent.**, Beijing, v. 9 (12), p. 2642-2649, 2003.

CHUNG KT, CHEN SC, CLAXTON LD. Review of the *Salmonella typhimurium* mutagenicity of benzidine, benzidine analogues, and benzidine-based dyes. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 612 (1), p. 58-76, 2006

CHUNG, K.T., STEVENS, S.E., CERNIGLIA, C.E. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. **Crit. Rev. Microbiol.**, Boca Raton, v. 18, p. 175-190, 1992.

CHUNG, K.T.; STEVENS, S.E. The reduction of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environ. Toxicol. Chem.**, New York, v. 12, p. 2121-2132, 1993.

COHEN, S.M., ELLWEIN, L.B. Cell proliferation in carcinogenesis. **Science**, Washington, v. 249 (4972), p. 1007-1111, 1990.

COHEN, S.M. Alternative models for carcinogenicity testing: weight of evidence evaluations across models. **Toxicol. Pathol.**, Lawrence, v. 29 suppl., p. 183-190, 2001.

COLUSSI, C., FIUMICINO, S., GIULIANI, A., ROSINI, S., MUSIANI, P., MACRI, C., POTTEN, C.S., CRESCENZI, M., BIGNAMI, M. 1,2-Dimethylhydrazine-induced colon carcinoma and lymphoma in msh2(-/-) mice. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 93 (20), p. 1534-1540, 2001.

COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO (SABESP). **Programa de Uso Racional da água**. Disponível em: <http://www.sabesp.com.br/pura/o_que_e_pura/default.htm>. Acesso em: 12 dez. 2005.

DAUTERMAN, W.C. Metabolism of toxicants: Phase II reactions. In: HODGSON, E., LEVI, P.E. **Introduction to Biochemical Toxicology**. 2nd. Norwalk: Appleton & Lange, 1994. Ch. 5, p. 113-132.

DI GREGORIO, C., LOSI, L., FANTE, R., MODICA, S., GHIDONI, M., PEDRONI, M., TAMASSIA, M.G., GAFA, L., PONZ DE LEON, M., RONCUCCI, L. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. **Histopathol.**, Oxford, v. 30, p. 328-34, 1997.

DING, X., KAMINSKY, L.S. Human extrahepatic cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal Tracts. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 43, p. 149–173, 2003.

DIXON, K., KOPRAS, E. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, London, v. 14 (6), p. 441-8, 2004.

DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., MATZKIES, F. Selektive erzeugung von darmkrebs bei ratten durch 1,2-dimethyl- hydrazin. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 54, p. 285-286, 1967.

FAIRBAIRN, D.W., OLIVE, P.L., O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mut. Res.**, Amsterdam, v. 339, p. 37–59, 1995.

GARRISON, A.W., HILL, D.W. Organic pollutants from mill persist in downstream water. **Amer. Dygest. Rep.**, v. 61, p. 21-25, 1972.

GHIA, M., MATTIOLI, F., MERETO, E. A possible medium-term assay for detecting the effects of liver and colon carcinogens in rats. **Cancer Lett.**, Virginia, v. 105, p. 71-75, 1996.

GLAUERT, H.P., WEEKS, J.A. Dose- and time-response of colon carcinogenesis in Fischer-344 rats after a single dose of 1,2-dimethylhydrazine. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v. 48 (3), p. 283-287, 1989.

GOLDIN, B.R., GORBACH, S.L. Effect of antibiotics on incidence of rat intestinal tumors induced by 1,2-Dimethylhydrazine Dihydrochloride. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 67, p. 877-880, 1981.

GOLDIN, B.R. *In situ* bacterial metabolism and colon mutagens. **Ann. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 40, p. 367-393, 1986.

GORBACH, S.L. The intestinal microflora and its colon cancer connection. **Infection**, Munich, v.10, p. 379-384, 1982.

GORBACH, S.L. & GOLDIN, B.R. The intestinal microflora and the colon cancer connection. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v. 12, suppl. 2, p. 252-261, 1990.

GREGORY, P. Classification of dyes by chemical structures. In: WARING, D.; HALLAS, G. **The Chemistry and Application of Dyes**. 1nd. New York: Springer, 1990.

GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 71-78, 2000.

HEINEN, C.D., SHIVAPURKAR, N., TANG, Z., GRODEN, J., ALABASTER, O. Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 56, p. 5339-5341, 1996.

HICKMAN, D., POPE, J., PATIL, S.D., FAKIS, G., SMELT, V., STANLEY, L.A., PAYTON, M., UNADKAT, J.D. SIM, E. Expression of arylamine *N*-acetyltransferase in human intestine. **Gut**, London, v.42, p. 402-409, 1998.

HOWARD, P.C., BELAND, F.A., CERNIGLIA, C.E. Reduction of the carcinogen 1-nitropyrene to 1-aminopyrene by the intestinal bacteria. **Carcinogenesis**, London, v. 4, p. 985-990, 1983.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/suppl7.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), Ministério da Saúde. **Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>>. Acesso em: 20 jan. 2006.

ITO, N., IMAIDA, K., TAMANO, S., HAGIWARA, A., SHIRAI, T. Medium-term bioassays as alternative carcinogenicity test. **J. Toxicol. Sci.**, Sapporo, v. 23, Suppl 2, p. 103-106, 1998.

JACKSON, P.E., COOPER, D.P., O'CONNOR, P.J., POVEY, A.C. The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumours: tumour development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event. **Carcinogenesis**, London, v. 20 (3), p. 509-513, 1999.

JEN, J., POWELL, S.M., PAPADAPPOULOS, N., SMITH, K.J., HAMILTON, S.R. VOGELSTEIN, B., KINSLER, K.W. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 54, p. 5523-6, 1994.

KLAUDE, M., ERIKSSON, S., NYGREN, J., AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 363, p. 89-96, 1996.

KROSCWITZ, J.I.; HOWE-GRANT, M. **Encyclopedia of chemical technology**. 4nd. : New York: John Wiley & Sons, 1993.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 78-82, 2002.

LAMONT, J.T. & O'GORMAN, T.A. Experimental colon cancer. **Gastroenterology**, Baltimore, v.75 (6), p. 1157-1169, 1978.

LAQUER, G.L., MCDANIEL, E.G., MATSUMOTO, H. Tumor induction in germfree rats with methylazoxymethanol (MAM) and synthetic MAM acetate. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 39, p. 355-371, 1967.

LIPPMAN, S.M., LEE, J.S., LOTAN, R., HITTELMAN, W., WARGOVICH, M.J., HONG, W.K. Biomarkers as intermediate end points in chemoprevention trials. **J. Nat. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 82, p. 555-60, 1990.

MAGUIRE, R.J., TKACZ, R.J. Occurrence of dyes in the Yamaska River., Quebec. **Water Poll. Res. J. Canada**, Ontario, v. 26, p. 145-161, 1991.

MANNING, B.W., CERNIGLIA, C.E., FEDERLE, T.W. Biotransformation of 1-nitropyrene to 1-*N*-formyl-1-aminopyrene by the human intestinal microflora. **J. Toxicol. Environ. Health**, Washington, v. 18, p. 339-346, 1986.

MCLELLAN, E.A., BIRD, R.P. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the colon. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 48, p. 6187-6192, 1988.

MOLLER, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 96 Suppl 1, p. 1-42, 2005.

MOUSTACCHI, E. Molecular mechanisms of carcinogenesis: the role of systems of DNA repair. **Bull Acad Natl Med.**, Paris, v. 182 (1), p. 33-47, 1998.

MUSSALI-GALANTE, P., AVILA-COSTA, M.R., PIÑÓN-ZARATE, G., MARTÍNEZ-LEVY, G., RODRÍGUEZ-LARA, V., ROJAS-LEMUS, M., AVILA-CASADO, M.C., FORTOUL, T.I. DNA damage as an early biomarker of effect in human health. **Toxicol. Ind. Health**, Princeton, v. 21, p. 155-166, 2005.

NIGAM, P., BANAT, I.M., SINGH, D., MARCHANT, R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. **Process Biochem.**, London, v. 31, p. 435-442, 1996.

NUCCI, M.R., ROBINSON, C.R., LONGO, P., CAMPBELL, P., HAMILTON, S.R. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum. Pathol.*, Philadelphia, v. 28, p. 1396-407, 1997.

OSTLING, O., JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 123(1), p. 291-298, 1984.

PEREIRA, M.A., BARNES, L.H., RASSMAN, V.L., KELLOFF, G.V., STEELE, V.E. Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. **Carcinogenesis**, London, v. 15, p. 1049-1054, 1994.

PITOT, H.C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, West Orange, v. 72 (3 Suppl), p. 962-70, 1993.

POLYAK, K., HAMILTON, S.R., VOGELSTEIN, B., KINSLER, K.E. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colo-rectal neoplasia. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 149, p. 381-387, 1996.

POWELL, A.A., LARUE, J.A., BATTA, A.K., MARTINEZ, J.D. Bile acid hydrophobicity is correlated with induction of apoptosis and/or growth arrest in HCT116 cells. **Biochem. Journ.**, London, v. 356, p. 481-486, 2001.

PRETLOW, T.P., BARROW, B.J., ASHTON, W.S., O'RIORDAN, M.A., PRETLOW, T.G., JURCISEK, J.A., STELLATO, T.A. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 51(1), 1564-1567, 1991.

RAFII, F., FRANKLIN, W., CERNIGLIA, C.E. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 56 (7), p. 2146-2151, 1990.

RAFII, F.; HALL, J.D.; CERNIGLIA, C.E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p. 897-901, 1997.

ROBINSON, T., McMULLAN, G., MARCHANT, R., NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Biores. Technol.**, New York, v. 77, p. 247-255, 2001.

RODRIGUES, M.A.M., SILVA, L.A.G., SALVADORI, D.M.F., CAMARGO, J.L.V., MONTENEGRO, M.R. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparasion between a short-and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 351-355, 2002.

RUBIO, C.A., NYLANDER, G., SVEANDER, M., DUVANDER, A., ALUN, M.L. Minimal invasive carcinoma of the colon in rats. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 123, p. 161-165, 1986.

SASAKI, Y.F., SEKIHASHI, K., IZUMIYAMA, V., NISHIDATE, E., SAGA, A., ISHIDA, K., TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and US NTP carcinogenicity database. **Crit. Rev. Toxicol.**, Boca Raton, v. 30, p. 629–799, 2000.

SEKIHASHI, K., SASAKI, T., YAMAMOTOA, A., KAWAMURA, K., IKKA, T., TSUDA, S., SASAKI, Y.F. A comparison of intraperitoneal and oral gavage administration in comet assay in mouse eight organs. **Mut. Res.**, Amsterdan, v. 493, p. 39–54, 2001.

SHPITZ, B., HAY, K., MEDLINE, A., BRUCE, W.R., BULL, S.B., GALLINGER, S., STERN, H. Natural history of aberrant crypt foci- A surgical approach. **Dis. Colon Rectum**, Philadelphia, v. 39 (7), p. 763-767, 1996.

SIMON, G.L., GORBACH, S.L. The human intestinal microflora. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 31, p. 147-162, 1986.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 175, p. 184-191, 1988.

SMITH, A.J., STERN, H.S., PENNER, M., HAY, K., MITRI, A., BAPAT, B.V., GALLINGER, S. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 54, p. 5527-5530, 1994.

SOHN, O.S., ISHIZAKI, H., YANG, C.S. FIALA, E.S. Metabolism of azoxymethane, methylazoxymethanol and *N*-nitrosodimethylamine by cytochrome P450IIE1. **Carcinogenesis**, London, v. 12 (1), p. 127-131, 1991.

SONO, M., ROACH, M.P., COULTER, E.D., DAWSON, J.H. Heme-Containing Oxygenases. **Chem. Rev.**, Washington, v. 96 (7), p. 2841-2888, 1996.

STRAUSS, G.H.S. Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT) I. Toxic and immunotoxic effects. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 252, p. 1-15, 1991.

SUBACH, O.M., BASKUNOV, V.B., DARII, M.V., MALTSEVA, D.V., ALEXANDROV, D.A., KIRSANOVA, O.V., KOLBANOVSKIY, A., KOLBANOVSKIY, M., JOHNSON, F., BONALA, R., GEACINTOV, N.E., GROMOVA, E.S. Impact of benzo[a]pyrene-2'-deoxyguanosine lesions on methylation of DNA by SssI and HhaI DNA methyltransferases. **Biochemistry**. Washington, v. 45 (19), p. 6142-6159, 2006.

SUTHERLAND, L.A., BIRD, R.P. The effect of chenodeoxycholic acid on the development of aberrant crypt foci in the rat colon. **Cancer Lett.**, Virginia, v. 76, p. 101-107, 1994.

TSUBOY, M.S., MANTOVANI, M.S., ANGELI, J.P.F., KNASMÜLLER, S., UMBUZEIRO, G.A., RIBEIRO, L.R. Efeito genotóxico, mutagênico e citotóxico do corante Ci Disperse Blue 291 em linhagem celular hepática humana (HepG2). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29 (3), 2006. Supplement. Programa e resumo 52nd. Congresso Brasileiro de Genética, 2006 apresentado em Foz do Iguaçu.

TSUDA, S., MATSUSAKA, N., MADARAME, H., UENO, S., SUSAKI, N., ISHIDA, K., KAWAMURA, N., SEKIHASHI, K., SASAKI, Y.F. The comet assay in eight mouse organs: results with 24 azo compounds. **Mut. Res.**, Amsterdam, v. 465, p. 11-26, 2000.

TUDEK, B., BIRD, R.P., BRUCE, W.R. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 49, p. 1236-1240, 1989.

UMBUZEIRO G.A., FREEMAN, H.S., WARREN, S.H., DE OLIVEIRA, D.P., TERAOKA, Y., WATANABE, T., CLAXTON, L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. **Chemosphere**, Oxford, v. 60(1), p. 55-64, 2005a.

UMBUZEIRO, G.A., FREEMAN, H., WARREN, S.H., KUMMROW, F., CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 43, p. 49-56, 2005b.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **High Production Volume (HPV) Challenge Program**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/HPV/volchall.htm>>. Acessado em: 10 maio 2006a.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Robust Summaries & Test Plans: Acetamide, N-[5-[bis[2-(acetyloxy)ethyl]amino]-2-[(2-bromo-4,6-dinitrophenyl)azo]-4-methoxyphenyl] Disperse Blue 79:1**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppt/chemrtk/acetamid/c13461tc.htm>>. Acessado em: 10 maio 2006b.

VALVERDE, M., DEL CARMEM LOPEZ, M., LOPEZ, I., SANDCHEZ, I., FORTOUL, T.I., OSTROSHY-WEGMAN, P., ROJAS, E. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. **Environ. Mol. Mutagen.**, New York, v. 30, p. 147-152, 1997.

VAN DER MEER, R., LAPRE, J.A., GOVERS, M.J., KLEIBEUKER, J.H. Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis. **Cancer Lett.**, Virginia, v. 114 (1-2), p. 75-83, 1997.

VICTÓRIO, P.C., BORGES, J.M.P.B., PINHEIRO, F., UMBUZEIRO, G.A., BARROS, S.B.M., GOMES, O.F., MEDEIROS, M.H.G., DI MASCIO, P., LOUREIRO, A.P.M. Modulação de 8-oxodGuo em DNA de fígado de ratos tratados com o corante CI Disperse Blue 291. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, p. 124, 2005. Suplemento. Programa e resumo XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005 apresentado em Recife.

WARD, J.B., HENDERSON, R.E. Identification of needs in biomarker researchs. **Environ. Health Perspect.**, Research Triangle Park, v. 104, p. 505-513, 1996.

WATANABE, T., SHIOZAWA, T., TAKAHASHI, Y., TAKAHASHI, T., TERAOKA, Y., NUKAYA, H., TAKAMURA, T., SAWANISHI, H., OHE, T., HIRAYAMA, T., WAKABAYASHI, K. Mutagenicity of two 2-phenylbenzotriazole derivatives, 2-[2-(acetylamino)-4-(diethylamino)-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole and 2-[2-(acetylamino)-4-(diallylamino)-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole and their detection in river water in Japan. **Mutagenesis**, Oxford, v.17, p. 293-299, 2002.

WEISBURGER, J.H. Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. **Cancer**, West Orange, v. 28 (1), p. 60-70, 1971.

WHITELEY, L.O.; HUDSON, L.J.R, PRETLOW, T. Aberrant crypt foci in the colonic mucosa of rats treated with a genotoxic and nongenotoxic colon carcinogen. **Toxicol. Pathol.**, Lawrence, v. 24, p. 681-689, 1996.

WIJNANDS, M.V.W., VAN ERK, M.J., DOORNBOS, R.P., KRUL, C.A.M., WOUTERSEN, R.A. Do aberrant crypt foci have predictive value for the occurrence of colorectal tumours? Potential of gene expression profiling in tumours. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 42, p. 1629-1939, 2004.

YAMADA, Y. YOSHIMI, N., HIROSE, Y. KAWABATA, K., MATSUNAGA, K., SHIMIZU, M., HARA , A., MORI, H. Frequent β -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 60, p. 3323-3327, 2000.

YAMADA, Y. AND MORI, H. Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in rodents: a new concept. **Carcinogenesis**, London, v. 24(6), p. 1015-1019, 2003.

ZEDEK, M.S., GRAB, D.J., STERNBERG, S.S. Differences in the acute response of the various segments of the rat intestine to treatment with the intestinal carcinogen methylazoxymethanol acetate. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 37, p. 32-36, 1977.