





Indução de Adenocarcinoma de Cólon em *Rattus Norvegicus* Wistar por 1,2-Dimetilhidrazina

Colon Adenocarcinoma Induction in Rattus Norvegicus Wistar by 1,2-Dimethylhydrazine

- ¹ Bruno Carlos Teixeira da Silva  
- ¹ Vinícius Monteiro Couvain 
- ² Carlos Alberto Sanches Pereira 

-
- ¹ Graduação em Ciências Biológicas - Biotecnologia. Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA.
- ² Doutor em Biotecnologia Industrial. Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA.

Resumo

Avalia-se que o adenocarcinoma de cólon seja uma causa de morte prematura e uma questão de saúde pública por ser o terceiro tipo de câncer mais comum em homem e o segundo mais frequente em mulheres no Brasil. O adenocarcinoma de cólon se origina na luz do intestino grosso e pode apresentar quadros clínicos tratáveis. Os modelos experimentais se tornam uma fonte para os estudos de novas técnicas que visam à prevenção e ao tratamento. Os ratos se apresentam como uma forma de estudo e desenvolvimento do adenocarcinoma de cólon induzido por 1,2-dimetilhidrazina (DMH). Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo induzir o adenocarcinoma de cólon em *Rattus norvegicus* Wistar por meio da DMH. Os animais foram submetidos a aplicações semanais de DMH por via subcutânea. Após 90, 170 e 353 dias, os animais foram eutanasiados e verificou-se que houve a formação de pólipos adenomatosos, um adenocarcinoma e a manifestação de metástase em tecidos próximos. Demonstrou-se que o modelo pode ser aplicado para outros estudos, visando às alterações moleculares, mas também para estudos com tumores estabelecidos e para o monitoramento de casos de metástase.

Palavras-chave:

Adenocarcinoma. Câncer de cólon. Modelo experimental. 1,2-dimetilhidrazina. *Rattus norvegicus*.

Abstract

*Colon adenocarcinoma is estimated to be a cause of premature death and a public health issue as it is the third most common type of cancer in men and the second most frequent type in women in Brazil. Colon adenocarcinoma originates in the lumen of the large intestine and can present treatable clinical conditions. Therefore, experimental models become a source for new techniques' studies which aim is the prevention and treatment. The rats are presented as a way of studying and developing colon adenocarcinoma induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH). Thus, the present study aims to induce colon adenocarcinoma in *Rattus norvegicus* Wistar through DMH. The animals were submitted to weekly applications of DMH subcutaneously. After 90, 170 and 353 days, the animals were euthanized and it was found that there was formation of adenomatous polyps, an adenocarcinoma and the manifestation of metastasis in nearby tissues. It has been shown that the model can be applied for studies aiming at molecular alterations, but also to studies with established tumors and to monitor cases of metastasis.*

Keywords:

Adenocarcinoma. Colon cancer. Experimental model. 1,2-dimethylhydrazine. Rattus norvegicus.

1 INTRODUÇÃO

Os tumores podem ser definidos como um grupo de células que se proliferam de forma descontrolada e desordenada. Esse comportamento se deve a mutações no genoma celular que surgem de forma aleatória, induzida ou facilitada e adquirem potencial carcinogênico (PITOT, 1993; VAN ENGELAND *et al.*, 2011; SABBAGA, 2013). Esses eventos ocorrem de diferentes formas nas células tumorais, sendo a autossuficiência relacionada a fatores de crescimento, insensibilidade a fatores inibitórios, evasão a apoptose, angiogênese, alto potencial de replicação, invasão tecidual, e metastatização (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O câncer se configura como um problema de saúde pública e se faz presente em casos de morte prematura. No Brasil, estima-se uma ocorrência de 625 mil novos casos, no período compreendido entre os anos 2020 e 2022. Ao se observar somente uma parcela dos casos mundiais, o câncer de cólon e reto é o terceiro em números de incidência na população mundial, afetando mais de 1,8 milhão de pessoas (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil, avalia-se 20.520 novos surgimentos de adenocarcinomas de cólon, em homens, e 20.470, em mulheres, sendo o terceiro mais comum, em homens, e o segundo, em mulheres (INCA, 2019).

O adenocarcinoma de cólon se origina a partir de pólipos que crescem em direção à luz do intestino. O tumor de colorretal é um tipo de câncer que apresenta quadros clínicos tratáveis e, na maioria dos casos, o resultado é a cura (INCA, 2019). Contudo, o rastreamento e a identificação prematura dessas estruturas são fundamentais para um tratamento eficaz e assertivo (BRASIL, 2003; RYAN, 2015).

Dessa forma os modelos de carcinogênese experimental em animais se mostram como uma importante fonte de dados, tanto para diagnósticos mais precisos quanto para a aplicação de novas opções de tratamento (ALVES *et al.*, 2004; BELOV; ZHOU; CHRISTOPHERSON, 2010; LIMA *et al.*, 2010), visto que, para o desenvolvimento de novas terapias, por exemplo, precisa-se entender e observar como ocorre o mecanismo de tumorigênese *in vivo*, uma vez que o conhecimento se baseia principalmente em análises *in vitro*, como células neoplásicas colhidas de amostras provenientes de intervenções cirúrgicas (CONMY; NASHEUER, 2010).

Para identificar possíveis alvos terapêuticos do câncer, os processos envolvidos na tumorigênese devem ser entendidos em todos os níveis, o que requer o desenvolvimento de sistemas-modelo que imitem com precisão o desenvolvimento do tumor. O uso de animais como modelos experimentais para indução química de câncer permite obter informações sobre as características do desenvolvimento e a modulação da doença (MA *et al.*, 1996). O câncer de cólon intestinal pode ser induzido em modelos experimentais, utilizando-se 1,2-dimetilhidrazina (DMH), um carcinógeno de ação indireta que possui um alto grau de especificidade para o cólon de variadas espécies de roedores (NEWELL; HEDDLE, 2004).

A DMH é ativada no fígado, metabolizada a metilazoximetanol, conjugado com o ácido β -glicurônico e transportado até o cólon. No intestino, por meio da β -glicuronidase, o azoximetano é liberado e configurado como um composto cancerígeno ativo (LAMONT; O'GORMAN, 1978). Devido à instabilidade da substância, ocorre a sua decomposição em formaldeído, água, nitrogênio e metildiazônio com um íon carbônico reativo (WEISBURGER, 1971; NAGASAWA; SHIROTA; MATSUMOTO, 1978). Assim, a ação da DMH se dá pela formação de compostos que induzem a metilação do DNA de células epiteliais do cólon (HAWKS *et al.*, 1974).

O presente trabalho teve como objetivo induzir a formação de tumores no cólon de ratos, *Rattus norvegicus* Wistar, utilizando 1,2-dimetilhidrazina.

2 METODOLOGIA

Foram utilizados 12 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* Wistar, com cerca de quatro meses de idade, adquiridos e mantidos no Biotério do Centro Universitário de Volta Redonda - UniFOA. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, sob o número 035/18.

Os animais foram separados em dois grupos, com seis animais, dispostos em quatro gaiolas plásticas com maravalha. Semanalmente, recebiam até 900 g de ração comercial, água *ad libitum* e eram mantidos em períodos regulares de claro e escuro diariamente. Os grupos foram caracterizados como Grupo Azul, determinado como forma de controle, e Grupo Verde, estabelecido para a indução tumoral (Figura 1).

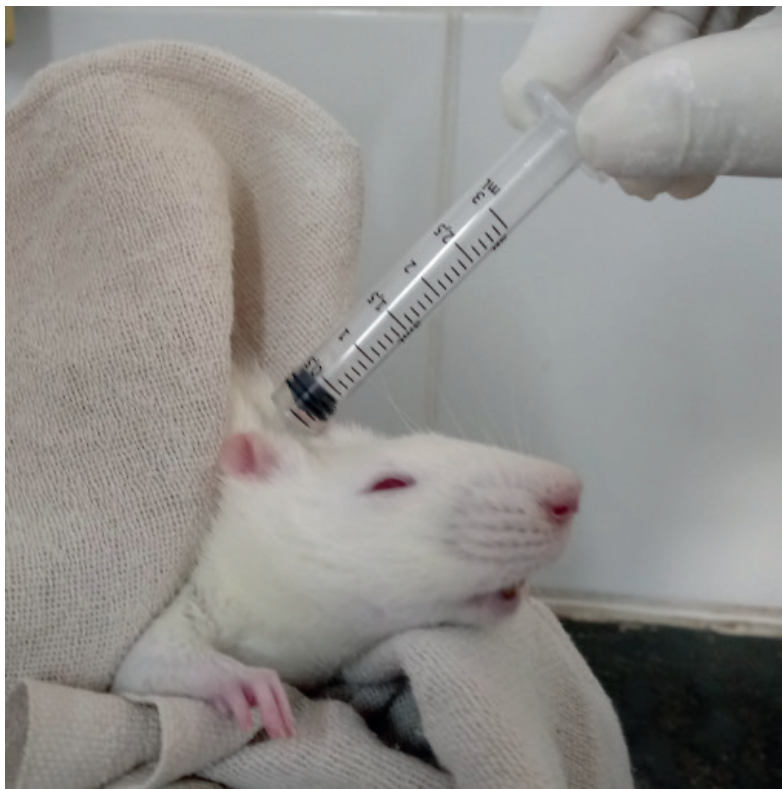
A indução da formação tumoral ocorreu por meio de injeções (Figura 2) semanais subcutâneas de 1,2-dimetilhidrazina a 40mg/kg em solução de NaCl 0,9%, durante quatro semanas. Os animais do Grupo Azul receberam aplicações de solução de NaCl 0,9% estéril, durante o mesmo período como forma de placebo.

Figura 1 - Disposição dos grupos de animais.



Fonte: Autores.

Figura 2 - Aplicação subcutânea de solução de 1,2-dimetilhidrazina.



Fonte: Autores.

Passados 90, 170 e 353 dias, dois animais de cada grupo foram submetidos a processo de anestesia profunda, utilizando-se xilazina 100 mg/Kg, quetamina 100 mg/Kg, em associação com lidocaína 10 mg/mL, o que possibilitou a eutanásia (BRAZ *et al.*, 2003; CFMV, 2013; CONCEA, 2013).

Após a eutanásia, os animais foram necropsiados (Figura 3) para obtenção dos intestinos, que foram coletados por meio de uma incisão xifo-pubiana, com abertura completa do abdômen e remoção de todo o intestino grosso (CARDOSO, 2002). Durante o procedimento, os órgãos abdominais foram observados para se investigar possíveis casos de metástases para outros tecidos.

Figura 3 - Necropsia e observação dos órgãos abdominais.



Fonte: Autores.

Os fragmentos intestinais foram lavados com solução de NaCl 0,9% para remoção de resíduos fecais e seleção de regiões com formação tumoral. Os fragmentos foram armazenados em frascos contendo formaldeído 10%, para posterior análise macroscópica das formações tumorais (JUSTIL; ARROYO; VALENCIA, 2010).

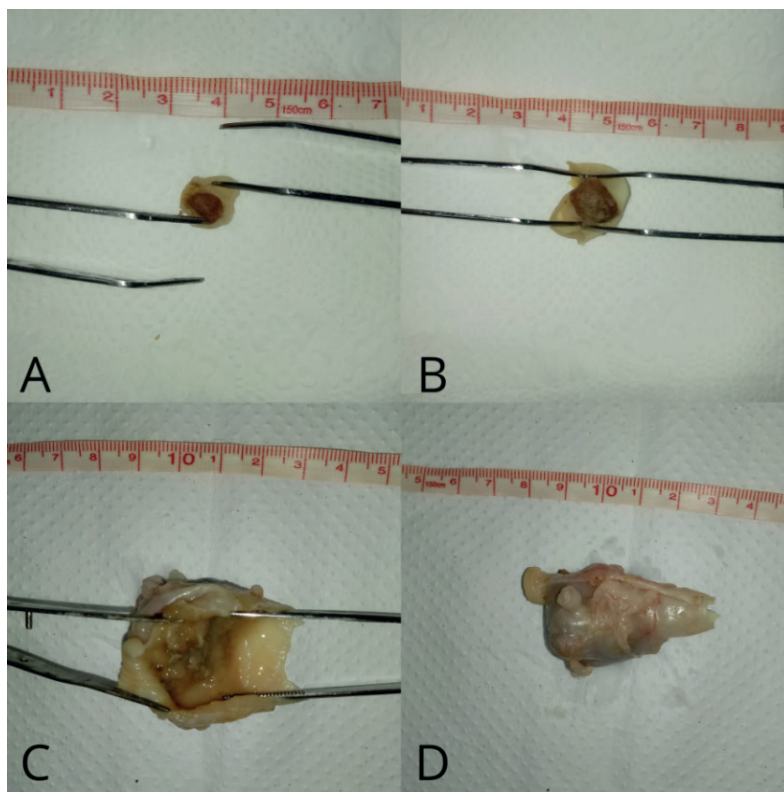
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais do Grupo Verde, que foram submetidos à tumorigenese induzida, desenvolveram formações tumorais, passíveis de observação macroscópica, 90 dias após as aplicações de 1,2-dimetilhidrazina. Os animais do Grupo Azul foram empregados como grupo-controle para se verificar possíveis alterações na saúde que não estivessem relacionadas com a indução dos tumores.

Para que ocorra o desenvolvimento do tumor, se faz necessário uma massiva proliferação celular de forma descontrolada, nesse caso, induzida pela exposição à DMH, a qual também provoca uma reação inflamatória no cólon (KRUTOVSKIKH; TUROSOV, 1994 *apud* LIMEIRAS, 2016; TOMATIS, 1993; LIU *et al.*, 2018). Com a multiplicação descontrolada, o tumor atinge estágio progressivo, sendo apenas uma questão de tempo para que as alterações microscópicas se tornem macroscópicas, possibilitando a fácil visualização e identificação do tumor (PITOT, 1993; JUCÁ *et al.*, 2014).

Dos seis animais que constituíam o Grupo Verde, foi observado que apenas três desenvolveram formações macroscópicas (Figura 4). Quanto aos outros três animais, não foram possíveis as observações macroscópicas dos tumores, pois correspondiam a dois animais eutanasiados até 90 dias após a exposição à DMH e a um animal que morreu naturalmente no decorrer do experimento.

Figura 4 - Fragmentos intestinais com formação tumoral. (A) Tumor de 0,8 cm, 170 dias após exposição à DMH. (B) Tumor com 1 cm, 170 dias após exposição à DMH. (C) Tumor com 3 cm, 353 dias após exposição à DMH. (D) Face externa do intestino observado em C.



Fonte: Autores.

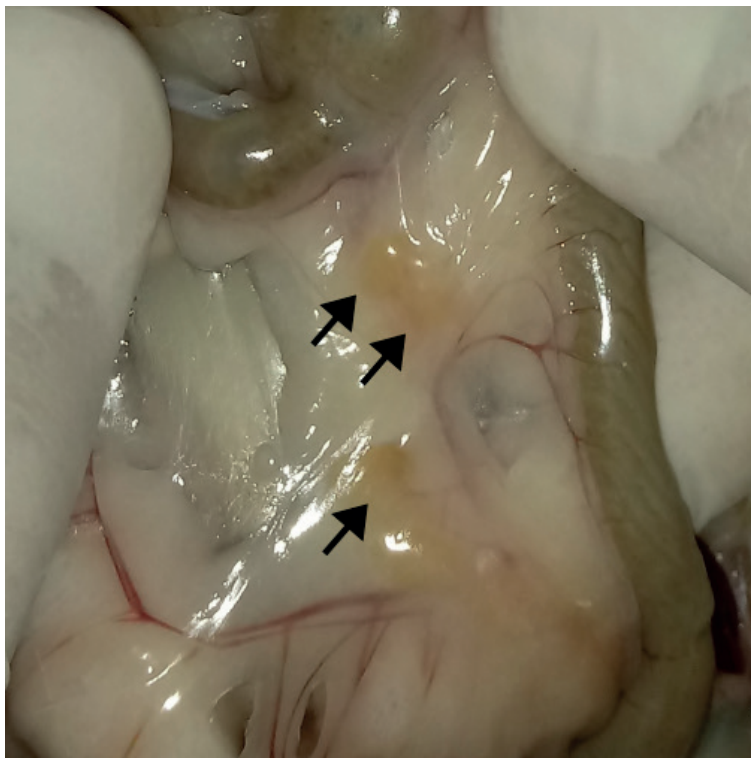
Os tumores que progrediram até 170 dias após exposição se apresentavam como pólipos adenomatosos, fixos em um ponto da parede interna do cólon, com forma bem definida, e com apenas 0,2 cm de diferença no comprimento, um com 0,8 cm e o outro com 1 cm. Já o tumor que se desenvolveu até 353 dias após a exposição à DMH, apresentava forma indefinida de um adenocarcinoma de células escamosas, não apresentando delimitações, e com cerca de 3 cm de comprimento. O mesmo ainda apresentava formação de pólipos na face externa do intestino.

Em menos de 90 dias de exposição à DMH, as alterações no tecido permanecem microscópicas, com modificações nas criptas de Lieberkühn. A proliferação se mantém contínua e, em torno de 130 dias, os tumores já podem apresentar um volume suficiente para obstruir o reto, com o desenvolvimento de pólipos. Com cerca de 200 dias, os animais, além de apresentarem os pólipos, desenvolvem a formação de um adenocarcinoma em uma mucosa desarranjada (THURNHERR *et al.*, 1973; CHANG 1986; LARANGEIRA *et al.*, 1998; PERŠE; CERAR, 2005).

A DMH se mostra como um composto cancerígeno altamente seletivo para neoplasias intestinais, com formação de neoplasias no intestino delgado e cólon de ratos (DRUCKREY *et al.*, 1967 *apud* LIMEIRAS, 2016). Contudo, com a existência de um tumor invasivo, há possibilidade de ocorrência de metástase e disseminação das células cancerosas por tecidos próximos ou distantes (INCA, 2011). Metástases podem ser definidas como implantes tumorais descontínuos do tumor primário, considerados malignos, visto que tumores benignos não desencadeiam metástase (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004).

A investigação por metástase nos órgãos da cavidade abdominal revelou o desenvolvimento de três formações tumorais no mesentério do rato eutanasiado até 353 dias após a exposição à DMH e, em nenhuma outra área abdominal além das formações típicas por indução da DMH (Figura 5).

Figura 5 - Exposição do mesentério. Setas indicando as formações tumorais.



Fonte: Autores.

4 CONCLUSÃO

Nota-se que a utilização da DMH para indução de tumores é relevante não somente para ensaios relacionados a alterações moleculares, como o metabolismo de compostos cancerígenos que induzem modificações genéticas, mas também para estudos relacionados a tumores agressivos, nos quais a evolução do tumor se torne indispensável, como para análises de metástase.

Como demonstrado, a 1,2-dimetilhidrazina é um potente e seletivo indutor de adenocarcinoma de cólon. Nos ratos, o composto se torna eficiente na produção de modelos experimentais por induzir alterações morfológicas, lesões na mucosa intestinal, semelhantes as que ocorrem em humanos.

Dessa forma, torna-se fundamental para o estudo de novas técnicas de tratamento, prevenção e análise molecular acerca do desenvolvimento e funcionamento do adenocarcinoma de cólon.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação Oswaldo Aranha, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. P. N. N. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker 256. **Acta Cir. Bras.** v.19, n. 4, Jul./Ago. 2004.
- BELOV, L.; ZHOU, J.; CHRISTOPHERSON, R. I. Cell surface markers in colorectal cancer prognosis. **Int J Mol Sci.** v. 12, n. 1, p. 78 - 113, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Falando sobre câncer do intestino.** Rio de Janeiro, 2003. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/falando-sobre-cancer-de-intestino>. Acesso em: 21 maio 2020.
- BRAY, F.; et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: Cancer J. Clin.** v. 68, n. 6, p. 394 - 424, Nov. 2018.
- BRAZ F.; et al. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v. 18, n. 1, p. 19 - 24, 2003.
- CARDOSO, C. V. P. Técnica de necropsia. In: ANDRADE, A., PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. org. **Animais de Laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.
- CFMV. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados.** 1 v. Brasília, 2012. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/arquivos-publicacoes-bem-estar-animal/guia-brasileiro-de-boas-praticas-para-a-eutanasia-em-animais.pdf/view>. Acesso em: 17 set. 2020.
- CHANG, W. W. The mode of growth and compartmentalization of neoplastic glands during experimental colon carcinogenesis. **Am. J. Pathol.** v. 124, n. 3, p. 420 - 426, Set. 1986.
- CONCEA. **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA.** Brasília, 2013. Disponível em: <https://www.unifoa.edu.br/ceua>. Acesso em: 16 set. 2020.
- CONMY, S.; NASHEUER, H. P. The use of transgenic mice in cancer and genome stability research. **Subcell. Biochem.** v. 50, p. 325 - 336, 2010.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell,** v. 100, n. 1, pp. 57-70, 2000.
- HAWKS, A.; et al. Morphological and biochemical effects of 1,2-dimethylhydrazine and 1-methylhydrazine in rats and mice. **Br. J. Cancer.** v. 30, n. 5, p. 429 - 439, Nov. 1974.
- INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer.** Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/abc-do-cancer-abordagens-basicas-para-o-controle-do-cancer>. Acesso em: 06 out. 2020.
- INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 17 maio 2020.
- JUCÁ, M. J.; et al. Comparative study of 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane on the induction of colorectal cancer in rats. **J. Coloproctol.** v. 34, n. 4 p. 167 - 173, 2014.

JUSTIL, H.; ARROYO, J.; VALENCIA, J. Extracto etanólico de *Baccharis genistelloides* (carqueja) sobre el cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidrazina en ratas. **An. Fac. med.** v. 71, n. 2, p. 88 - 96, Abr./Jun. 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7. ed. New York: Saunders, 2004.

LAMONT, J. T.; O'GORMAN, T. A. Experimental colon cancer. **Gastroenterol.** v. 75, n. 6, p. 1157 - 1169, 1978.

LARANGEIRA, L. L. S. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no colón de ratos. **Acta Cir. Bras.** v. 13, n. 3, Jul./Ago./Set. 1998.

LIMA, H. M.; et al. Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors. **Arq. Gastroenterol.** v. 47, n. 2, 2010.

LIMEIRAS, S. M. A. **Efeitos do extrato etanólico de *Moquiniastrum polymorphum* sobre a carcinogênese colorretal induzida pela 1,2 dimetilhidrazina**, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2016.

LIU, C. et al. Phytic acid improves intestinal mucosal barrier damage and reduces serum levels of proinflammatory cytokines in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colorectal cancer model. **Br J Nutr.** v. 120, n. 2, p. 121 - 130, Jul. 2018.

MA, Q. et al. Diet and experimental colorectal câncer. **Nutri Reseac.** v. 16, n. 3, p. 413 - 26, 1996.

NAGASAWA, H. T.; SHIROTA, F. N.; MATSUMOTO, H. Decomposition of methylazoxymethanol the aglycone of cycasin in D₂O. **Nature.** v. 236, n. 5344, p. 234 - 235, 1978.

NEWELL, L. E.; HEDDLE, J. A. The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Mutat Res.** v. 564, n. 1, p. 1 - 7, Nov. 2004.

PERŠE, M.; CERAR, A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat - experimental colorectal carcinogenesis. **Radiol. Oncol.** v. 39, n. 1, p. 61 - 70, 2005.

PITOT, H. C. The molecular biology carcinogenesis. **Cancer.** v. 72, n. 3, p. 962 - 970, 1993.

RYAN, D. P. Câncer de Colo. In: CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Manual de oncologia de Harrison**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.

SABBAGA, J. Biologia molecular dos tumores do trato gastrointestinal. In: Hoff, P. M. G. (ed). **Tratado de oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p.1615-1624.

THURNHERR, N.; et al. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Research.** v. 33, p. 940 - 945, Mai 1973.

TOMATIS, L. Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on an IARC workshop report. **Environ Health Perspect.** v. 101, n. 5, p. 149 - 151, Dez. 1993.

VAN ENGELAND, M.; et al. Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. **J Clin Oncol.** v. 29, n. 10, p. 1382 - 1391, Abr. 2011.

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