Simone Moraes Palmeira

**Avaliação do potencial quimiopreventivo do óleo de Pequi
(*Caryocar brasiliense* Camb.) na hepatocarcinogênese
quimicamente induzida em camundongos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier
Hernandez Blazquez

São Paulo
2014

Simone Morais Palmeira

**Avaliação do potencial quimiopreventivo do óleo de Pequi
(*Caryocar brasiliense* Camb.) na hepatocarcinogênese
quimicamente induzida em camundongos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier
Hernandez Blazquez

São Paulo
2014

Nome: Palmeira, Simone Moraes

Título: Avaliação do potencial quimiopreventivo do óleo de Pequi (Caryocar brasiliense Camb.) na hepatocarcinogênese quimicamente induzida em camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Aprovado (a) em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Assinatura:

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

Dedicatória

À família Palmeira, minhas raízes.

*“Para cada árvore que atinge as alturas existe uma raiz
firme.” Nélío Da Silva*

Agradecimientos

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez por sua orientação com muita dedicação, seriedade e paciência. O Sr é o exemplo que pretendo seguir na minha futura vida de docente e pesquisadora. “A alma cresce à altura daquela que admira” E.G. White.

À Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Zaidan Dagli, por sua colaboração durante todas as etapas deste trabalho e especialmente com as análises patológicas. Agradeço sua imensa simpatia e seu otimismo em relação a este trabalho.

Ao Prof. Dr. César Koppe Grisolia da Universidade de Brasília - UnB, por ter nos cedido o óleo de Pequi.

À Dr^a Paula R. P. da Silva (Paulinha), pela cooperação em todo o desenvolvimento deste projeto, desde o momento em que ele era apenas uma ideia. Sou muito grata pela oportunidade que me destes.

Aos técnicos, Diogo Palermo (LAMIH) e Marguite (Laboratório de Oncologia Experimental) pela ajuda indispensável. Também aos funcionários do biotério do VPT, sempre dispostos a ajudar.

À equipe do LSSCA, em especial a Dr^a. Aline Ladd e Ana Paula pelo auxílio nas análises estereológicas.

À Juliana Ferrão (Juju) pelo auxílio nas coletas de sangue e também nas eutanásias dos animais.

Aos ICs, Willian Reina e Beatriz Calixto que auxiliaram nas colorações de HE e Eric Pimentel que auxiliou no tratamento dos animais durante o experimento.

Algumas pessoas especiais que de forma indireta, mas indispensável, participaram no produto final deste trabalho, também agradeço a eles:

Aos meus irmãos, em especial ao Samuel, Rai e Sâmila pelo apoio tanto emocional quanto financeiro e as cunhadas Patrícia Martins (Paty) e Laura Palmeira, pelo acolhimento durante estes últimos anos.

Ao amigo Carlos David (Carloncho) que sempre me auxiliou na busca dos artigos.

Aos colegas de laboratório pela vivência agradável e ajuda mesmo que em uma única dúvida sanada, agregou valor ao meu conhecimento e experiência de vida. Obrigada à Eduardo Malavasi, Cristiane Cagnoni, Fernanda Cardoso, João L. Mendonça, Joana Pinto, Leticia Palmeira e Rennan Olio, galera do “Ursinho Pimpão”.

Ao Maurício meu namorado, que mesmo não entendendo quase nada sobre o assunto deste trabalho, teve a paciência de lê-lo várias vezes para me ajudar com as correções. Obrigada, te amo.

Ao meu orientador de iniciação científica Prof. Dr. Helder Lopes Teles. O Sr despertou em mim a vontade de continuar a busca pelo conhecimento me inserindo na pesquisa científica e pelo exemplo de pesquisador ético, amante do conhecimento e excelente educador, muito obrigada.

Aos meus pais, Raimundo Palmeira e dona Neusa Palmeira porque mesmo quando erraram me ensinaram uma lição. Amo vocês.

À Deus por ter me conduzido até este momento, colocando as pessoas certas no meu caminho. A Ele toda honra.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos nº 2011/15415-6 e 2012/50373-5) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Figuras	14
Lista de siglas	17
Resumo	18
1 Introdução.....	21
2 Objetivos.....	27
3 Revisão da literatura	29
3. 1 Quimioprevenção do câncer	29
3. 2 O uso das plantas como fonte de recursos de agente quimiopreventivos	31
3. 3 Hepatocarcinogênese – modelo do camundongo jovem.....	32
3. 4 Citoqueratinas CK8/18	34
3. 5 Parâmetros enzimáticos da função hepática	35
3. 6 A espécie <i>Caryocar brasiliense</i> – Pequi	36
4 Métodos	40
4. 1 Preparo e análise química do óleo do Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb)	40
4. 2 Ensaio inicial.....	40
4. 3 Animais e ambiente de experimentação	41
4. 4 Modelo de hepatocarcinogênese	42
4. 5 Delineamento experimental	42
4. 6 Eutanásia dos animais e coleta de material.....	44
4. 7 Análise bioquímica	45
4. 8 Processamento do material para avaliação histopatológica	46
4. 8. 1 Avaliação histopatológica.....	46
4. 8. 2 Estudo estereológico	47
4. 8. 3 Imuno-histoquímica para CK8/18	49
4. 9 Análises estatística	49
5 Resultados.....	51

5. 1 Observações gerais	51
5. 2 Histopatologia.....	52
5. 3 Análise estereológica do fígado	56
5. 4 Bioquímica do soro	59
5. 5 Imuno-histoquímica para CK8/18	60
6 Discussão	62
7 Conclusão	73
8 Referências	74

Lista de Figuras

Figura 1 – Fruto do pequizeiro, Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Foto de José Antônio da Silva. Fonte: Revista de Biotecnologia ciência & Tecnologia.....35

Figura 2 – Delineamento experimental 27 semanas – Focos de hepatócitos alterados (FHA). C (Controle); DEN (dietilnitrosamina 10µg/g); OP400 (400 mg/kg de óleo de Pequi); DEN+OP100 (dietilnitrosamina 10µg/g + 100 mg/kg de óleo de Pequi); DEN+OP400 (dietilnitrosamina 10µg/g + 400 mg/kg de óleo de Pequi).....40

Figura 3 – Sistema teste - contagem de pontos sobre a lesão e o parênquima do fígado, para determinar a densidade de volume da lesão (Vv).....44

Figura 4 – Tipos de lesões observadas nos grupos DEN, DEN+OP100 e DEN+OP400. (A) Foco eosinófilo/acidófilo; (B) Adenoma de células claras; (C) Adenoma de células basofílicas; (D) Um pequeno FHA basófilo. Coloração por hematoxilina eosina (HE).....51

Figura 5 – Lesões pré-neoplásicas em remodelação (A) e persistente (B) em fígado de camundongos tratados com DEN + óleo de pequi. Objetiva de 20 x. Coloração em azul de toluidina.....52

Figura 6 – Gráfico representativo do volume total (Vtot) das lesões pré-neoplásicas (LPN) do fígado de camundongo nos diferentes grupos de estudo (DEN-

dietilnitrosamina 10µg/g; DEN+OP100 – dietilnitrosamina + 100 mg/kg de óleo de pequi; DEN+OP400 – dietilnitrosamina.....54

Figura 7 – Gráfico representativo da densidade de volume (Vv) das lesões pré-neoplásicas (LPN) do fígado de camundongo nos diferentes grupos de estudo (DEN- dietilnitrosamina 10µg/g; DEN100– dietilnitrosamina + 100 mg/kg de óleo de pequi; DEN400– dietilnitrosamina + 400 mg/kg de óleo de pequi).....55

Figura 8 – Imuno-histoquímica de focos basófilos e adenoma de células basofílicas em fígado de camundongos Balb/c tratados com dietilnitrosamina. (A e B) adenoma de células basofílicas e (B e C) FHA basófilo. (A e C) coloração de HE. (B e D) imuno-histoquímica para CK8/18.....57

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Potenciais mecanismos de agentes quimiopreventivos bloqueadores e supressores.....	28
Tabela 2 – Composição relativa do óleo da polpa de pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb) Adaptada de Miranda-Vilela et al., 2011.....	38
Tabela 3 – Peso corpóreo final, ganho de peso, peso do fígado e índice hepatossomático dos grupos experimentais – São Paulo, 2014.....	49
Tabela 4 – Índice de lesões pré-neoplásicas em remodelação dos grupos tratados com DEN e DEN + óleo de pequi. São Paulo. 2014.....	50
Tabela 5 – Parâmetros estereológicos do fígado. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo seguida do seu coeficiente de variação (CV) - São Paulo-2014.....	53
Tabela 6 – Determinação dos níveis de ALT e AST no soro dos animais tratados e não tratados com óleo de pequi. São Paulo, 2014.....	56

Lista de siglas

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CHO-K1	Chinese hamster ovary cells
CK8/18	Cytokeratin 8/18
CV	Coeficiente de variação
DEN	Dietilnitrosamina
FHA	Foco de hepatócito alterado
HIS	Índice hepatossomático
LDL	Low Density Lipoproteins
LPN	Lesão pré-neoplásica
VTOT	Volume total
Vv	Densidade de volume

Resumo

Palmeira, SM. *Avaliação do potencial quimiopreventivo do óleo de pequi (Caryocar brasiliense Camb) na hepatocarcinogênese quimicamente induzida em camundongos* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A flora brasileira possui várias plantas com grande potencial quimiopreventivo contra processos neoplásicos, sendo uma delas o fruto do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Essa fruta da região central do Brasil contém na sua polpa e principalmente no extrato do óleo da sua polpa, várias substâncias antioxidantes. Relatos científicos recentes indicam que as substâncias no Pequi estão relacionadas com a intensificação do sistema imunológico e a redução do risco de doenças degenerativas como o câncer. Portanto, o presente trabalho avaliou o potencial quimiopreventivo do óleo de *Caryocar brasiliense* contra lesões hepáticas pré-neoplásicas induzidas quimicamente pela dietilnitrosamina (DEN) em camundongos. O iniciador dietilnitrosamina (DEN) na concentração de 10µg/g foi injetado intraperitonealmente em camundongos de 14 dias de idade. Foram formados cinco grupos experimentais: C (controle sem nenhum tratamento); DEN (Dietilnitrosamina 10µg); OP400 (óleo de Pequi 400mg/kg); DEN+OP100 (DEN+100mg/kg de óleo de Pequi); e DEN+OP400 (DEN+400 mg/kg de óleo de Pequi). Estes três últimos grupos receberam o óleo a partir do 30º dia até o 189º dia de vida. Os parâmetros estereológicos densidade de volume (Vv) e volume total (VTot) das lesões pré-neoplásicas (LPN) foram avaliados juntamente com a expressão das citoqueratinas CK8/18. O óleo de *C. brasiliense* reduziu o volume total das lesões pré-neoplásicas em 51% no fígado dos camundongos e em 20% no número total de animais acometidos com estas lesões na dose de 400 mg/kg. Redução no número de perfis de focos de hepatócitos alterados (FHA) CK8/18 – positivos foram observados no grupo DEN+OP400. Estes efeitos foram atribuídos às substâncias antioxidantes como os carotenóides (com ou sem atividade pró-vitamina A) e vitamina C que possivelmente atuaram na fase de promoção inibindo a proliferação celular e também pela indução da remodelação dos FHA. Portanto, concluímos que o óleo de *C. brasiliense* possui efeito hepatoprotetor no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em fígado de camundongos induzidos por DEN e com potencial para uso na prevenção do câncer hepático.

Descritores: Carcinogênese, Quimioprevenção, Fígado, Antioxidante, *Caryocar brasiliense*, camundongos.

Abstract

Palmeira, SM. *Evaluation of potential chemopreventive oil pequi (Caryocar brasiliense Camb) in chemically induced Hepatocarcinogenesis in mice* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

The Brazilian flora has several plants with large chemopreventive potential against neoplastic processes, being one of them the Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb). This fruit of the central region of Brazil contains at its pulp and especially in the oil extract of its pulp, various antioxidant substances. Recent scientific reports indicate that the substances in Pequi are related to the intensification of the immune system and the reduction of risk of degenerative diseases, such as cancer. Therefore, this study evaluated the chemopreventive potential of the *Caryocar brasiliense* oil against pre-neoplastic liver lesions chemically induced by diethylnitrosamine (DEN) in mice. The initiator diethylnitrosamine (DEN) at a concentration of 10 µg/g was intraperitoneally injected into 14 days of age mice. Five experimental groups were formed: C (control without any treatment); DEN (diethylnitrosamine 10 µg); OP400 (oil Pequi 400 mg/kg); DEN+OP100 (DEN + 100 mg/kg of Pequi oil); and DEN+OP400 (DEN + 400 mg/kg of Pequi oil). These last three groups received oil from the 30th day to the 189th day of life. The stereological parameters volume density (V_v) and total volume (V_{Tot}) of pre-neoplastic lesions (PNL) were evaluated together with the expression of cytokeratins CK8/18. The oil of *C. brasiliense* reduced the total volume of pre-neoplastic lesions in the liver in 51% of mice and 20% in the total number of affected animals with these lesions at a dose of 400 mg / kg. Reduction in the number of foci of altered hepatocytes (FAH) CK8/18 profiles-positive were observed in DEN+OP400 group. These effects have been attributed to antioxidants substances such as carotenoids (with or without provitamin A activity) and Vitamin C which possibly acted on the promotion stage inhibiting cell proliferation and also by inducing remodeling of FHA. Therefore, we conclude that the oil of *C. brasiliense* has hepatoprotective effect on the development of pre-neoplastic lesions in the mice liver induced by DEN and with potential for use in the prevention of liver cancer.

Descriptors: Carcinogenesis, Liver, Antioxidant, *Caryocar brasiliense*, Chemoprevention, Mice.

Introdução

1 Introdução

O expressivo aumento nos índices de incidência e mortalidade por câncer tem tornado a prevenção uma estratégia importante na redução da doença. Principalmente nas regiões em desenvolvimentos que são as que mais sofrem com a mortalidade, pois a população em geral não tem acesso aos tratamentos tradicionais, comumente caros. Neste sentido, a quimioprevenção é uma abordagem promissora na prevenção das neoplasias, podendo reduzir significativamente os índices de incidência e mortalidade, pois ela pode inibir, suprimir e reverter o processo de carcinogênese (Sporn, 1976; Kelloff et al., 2000; Surh, 2003; Steward e Brown, 2013). Os agentes naturais são utilizados nessa abordagem e desde o século passado uma grande quantidade desses agentes, inclusive os oriundos de plantas, vem sendo estudados, dos quais muitos têm demonstrado efeitos antitumorais.

As plantas são importantes fontes de compostos biologicamente ativos. Além da utilização como modelo para síntese de medicamentos usados no tratamento de várias doenças, inclusive o câncer, elas também são utilizadas de forma direta como fonte de compostos terapêuticos (Varanda, 2006; Souza-Moreira et al., 2008). A partir de estudos epidemiológicos e experimentais, há evidências que algumas plantas ou compostos isolados delas, possuem propriedades quimiopreventivas na carcinogênese humana (Surh, 2003). Os compostos como os tocóis, carotenóides, ácido ascórbico e compostos fenólicos como taninos e flavonoides, são substâncias conhecidas por seus potenciais efeitos antimutagênicos e antineoplásicos. Eles são considerados antioxidantes e estão presentes em plantas como frutas e vegetais, podendo ser incorporados ao organismo através da alimentação (Surh, 2003; Cerqueira et al., 2007;

Ferreira, 2009). Por isso, as plantas são consideradas como fonte de compostos que podem ser utilizados como estratégia quimiopreventiva de baixo custo, acessível e de fácil aplicabilidade no controle do câncer.

O Brasil é detentor de uma flora bastante diversificada e com grande potencial medicinal, porém pouco estudada (Varanda, 2006). O potencial da nossa flora como fonte de possíveis agentes quimiopreventivos foi demonstrado em alguns estudos anteriores realizados em nosso grupo. Estes trabalhos evidenciaram os efeitos anticarcinogênicos (Da Silva et al., 2005) de *Pfaffia paniculata* Kuntze, conhecida como Gingeng brasileiro e os efeitos antineoplásicos e antitumorais (Fukumaso et al., 2006) de *Paulinia cupania* Mart. Var. *sorbilis*, conhecido como Guaraná e utilizado em vários produtos alimentícios. Com o desafio em descobrir novos componentes quimiopreventivos presentes em plantas brasileiras, propomos avaliar o óleo de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb).

O Pequi é uma fruta nativa do Cerrado brasileiro, distribuída nas regiões centro-oeste, sudeste, sul, nordeste e norte. Na medicina popular o óleo é utilizado como tônico, por suas propriedades antioxidantes naturais (Mariano et al., 2009). A polpa de *C. brasiliense* é rica em lipídios (33,4%), possuindo um considerável teor de proteína. Na composição do óleo, verifica-se a presença de diversos ácidos graxos como o palmítico, oléico, palmitoléico, esteárico, linoléico e linolênico (Facioli e Gonçalves, 1997; Lima et al., 2007). É uma fruta que possui alto teor de vitaminas B1 e B2 (Oliveira et al., 2006), vitamina C com 78,3 mg/100g (Almeida et al., 1998; Mariano-da-Silva et al. 2009) e vitamina E com 0,607 mg/100g (Enes et al., 2011). Na sua composição ainda são encontrados carotenóides como β -caroteno, licopeno (Oliveira et al., 2006), ζ -caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina e

mutatoxantina (Ramos et al., 2001; Oliveira et al., 2006). A este grupo de compostos é atribuída a propriedade antioxidante que está relacionada com a intensificação do sistema imunológico e a redução do risco de doenças degenerativas como o câncer, entre outras (Britton, 1995; Rodriguez-Amaya, 1997; Ramos et al., 2001). Em estudos já realizados com *C. brasiliense* foi demonstrado efeitos antioxidativos (Lima e Mancini-Filho, 2005; Miranda-Vilela et al., 2011) e anticlastogênicos (Kiouri et al., 2007). Quando administrado a atletas, o óleo de pequi reduziu os danos no DNA e injúria nos tecidos, diminuiu o colesterol total e o LDL no sangue e também apresentou atividade anti-inflamatória (Miranda-Vilela et al., 2011).

Baseando-nos em estudos já realizados sobre o *C. brasiliense* e na sua composição rica em substâncias conhecidas pelas suas potenciais propriedades terapêuticas, avaliamos a hipótese de que o óleo de pequi possui efeito quimiopreventivo contra lesões hepáticas pré-neoplásicas induzidas quimicamente pela dietilnitrosamina (DEN) em camundongos.

Vários protocolos utilizam animais experimentais para detecção de substâncias potencialmente quimiopreventivas, entre estes está a hepatocarcinogênese em roedores. Por apresentar semelhanças com o câncer hepático humano, a indução da hepatocarcinogênese em roedores é considerada um indicador válido de risco de câncer, não apenas para o fígado, mas também para outros órgãos (Feo et al., 2000; Engelbergs et al., 2000; Bannasch et al., 2001; Leenders et al., 2008). Portanto, o modelo de hepatocarcinogênese em camundongos infantis de 12 a 15 dias de vida (Vesselinovitch e Mihailovich, 1983) foi utilizado neste estudo. Este protocolo dispensa a utilização do procedimento cirúrgico adicional, como a hepatectomia parcial, que pode levar a mortalidade dos animais experimentais. O modelo utiliza a proliferação de células

hepáticas, comum a esse período da vida do animal como promotor da formação das lesões pré-neoplásicas (Leenders et al., 2008). Entre outras vantagens do modelo, encontra-se também a simplificada forma de iniciação por dose única (Ward et al., 1996).

Para avaliar os efeitos protetores do óleo de Pequi, os focos de hepatócitos alterados (FHA) foram utilizados como marcadores. Os FHA precedem a manifestação de neoplasias no fígado e são considerados lesões pré-neoplásicas. Em hepatocarcinogênese experimental eles são úteis como biomarcadores de efeitos quimiopreventivos por possuírem similaridade com os FHA em hepatocarcinogênese humana (Bannasch et al., 1986; 2001; Ito, 2003; Chagas et al., 2011; Kushida et al., 2011). Os focos de hepatócitos alterados podem ser classificados com base em características citológicas e de coloração, sendo: focos basofílicos, eosinofílicos/acidófilo, claros ou de células mistas (Harada et al., 1999). Na hepatocarcinogênese em camundongos os focos podem ser diferenciados com base em sua coloração pela hematoxilina e eosina (HE). Os FHA pré-neoplásicos possuem a capacidade de remodelação para uma aparência de fígado normal e focos persistentes que proliferam e evoluem para uma neoplasia (Peres et al., 2003; Cardozo et al., 2011; Scolastici et al., 2014). A persistência dos focos pode indicar um bloqueio na remodelação por diferenciação ou apoptose e poderia estar relacionado com a maior tendência de evolução a um carcinoma hepatocelular (Fonseca et al., 2005; Cardozo et al., 2011). Assim, os FHA ainda podem ser classificados em persistentes ou em remodelação, sendo que estes são identificados por suas características morfológicas e coloração histoquímica. Nos FHA em remodelação marcadores histoquímicos previamente negativos retornam e os positivos desaparecem conferindo aos FHA uma

descoloração ou coloração não uniforme. Portanto, através de coloração histoquímica específica para um marcador positivo ou negativo é possível observar que os hepatócitos dos focos misturam-se com os do parênquima circunjacente, tornando suas delimitações menos definidas, diferente das LPN persistentes onde as delimitações são nítidas em toda sua extensão (Tatematsu et al. 1983; Mazzantini et al., 2008).

Apesar da validade dos FHA como marcador biológico em lesões pré-neoplásicas em camundongos, os corados por HE requerem cuidadosos exames histopatológicos, podendo ainda, alguns pequenos focos não serem percebidos. Portanto, a utilização de outros marcadores biológicos é importante. Em avaliações da hepatocarcinogênese CK 8/18 mostrou-se um adequado marcador de lesões hepáticas em camundongos (Kushida et al., 2011). As citoqueratinas 8 e 18, estão presentes nos hepatócitos adultos e são consideradas marcadores de injúria no fígado (Haybaeck et al., 2012). Em estudos anteriores, elas foram positivas em marcações por imuno-histoquímica em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em fígado de camundongos (Takehashi et. Al., 2010; Kushida et. Al., 2011). Portanto, para auxiliar na avaliação do estudo, a expressão das citoqueratinas 8/18 (CK8/18) foram avaliadas.

Alguns compostos hepatotóxicos ao serem metabolizados podem afetar alguns parâmetros da função hepática e podem ser avaliados por testes de enzimas específicas. Assim, as enzimas hepáticas Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT), foram mensuradas e usadas como indicadoras de possíveis injúrias ou propriedades protetoras, auxiliando nas demais avaliações deste estudo.

Objetivos

2 Objetivos

Avaliar o potencial quimiopreventivo do óleo de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) contra o desenvolvimento de lesões hepáticas pré-neoplásicas induzidas quimicamente pela dietilnitrosamina (DEN) em camundongos.

- ✓ Avaliar as lesões histopatológicas no fígado de camundongos pela mensuração da densidade de volume e volume total dos focos de hepatócitos alterados em animais tratados e não tratados com óleo de pequi.
- ✓ Avaliar a expressão da citoqueratina CK8/ 18 nas lesões hepáticas pré-neoplásicas de fígados de animais tratados e não tratados com óleo de Pequi como marcadores de estresse celular.

Revisão da literatura

3 Revisão da literatura

3.1 Quimioprevenção do câncer

Apesar de grandes avanços no conhecimento dos mecanismos da carcinogênese e o desenvolvimento de novas drogas, as neoplasias ainda mantêm altos índices de incidência e estão entre as principais causas de mortalidade no mundo. Há expectativa que esses índices continuem crescendo. O difícil tratamento associado aos altos custos motiva o interesse em estratégias de prevenção do câncer (Surh, 2003; Beltrão-Braga et al.; 2004; Steward e Brown, 2013). O aumento na compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da carcinogênese e o sucesso na prevenção de alguns cânceres como os de mama, colo e próstata torna a quimioprevenção uma abordagem promissora de combate às neoplasias (Steward e Brown, 2013).

Para entendermos como a quimioprevenção pode interferir no processo da carcinogênese é preciso conhecer como se dá o desenvolvimento desta. A carcinogênese pode ser induzida nos organismos vivos por agentes físicos, biológicos ou químicos e é um processo complexo que envolve múltiplas etapas na transformação das células normais em malignas (Pitot et al., 1996; Surh, 2003). No entanto, ela pode ser dividida operacionalmente em três estágios: a iniciação, caracterizada pela formação de uma célula pré-neoplásica resultante de uma mutação fixa em torno de síntese de DNA; promoção, estágio que envolve a expressão clonal seletiva da célula iniciada através do aumento do crescimento celular ou diminuição da apoptose; progressão, um evento genotóxico que resulta na mudança do estado pré-neoplásico. É uma fase caracterizada pela irreversibilidade e instabilidade genética que se traduz pelo aparecimento frequente

de aberrações cromossômicas nas células neoplásicas (Gomes-Carneiro, 1997; Trosko, 2003; Surh, 2003; Oliveira et al., 2007; Silva, 2009). Essa simplificação das três fases é útil para definir estratégias de quimioprevenção.

Definida como o uso de agentes naturais, sintéticos e biológicos para inibir, suprimir e reverter o processo de carcinogênese (Sporn, 1976; Kelloff e Boone, 1994; Suh, 2000), a quimioprevenção é dividida em três abordagens, sendo: primária, secundária ou terciária. A primeira refere-se a prevenir o início do câncer administrando um agente bloqueador a pessoas saudáveis ou com fator de risco, ou ainda evitando o contato destas com agentes carcinogênicos exógenos (Steward e Brown, 2013). Já a secundária visa identificar lesões pré-neoplásicas em indivíduos assintomáticos e controlar a evolução destas. Esta prevenção tem sido de fundamental importância para diminuir a incidência do câncer e a mortalidade causada por ele (Kelloff *et al.*, 1994; Sporn & Surh, 2000; Beltrão-Braga et al.; 2004). Por último a terciária é definida como sendo a administração de agentes para prevenir a recorrência ou um segundo câncer primário em indivíduos que foram submetidos a um tratamento bem sucedido da doença (Steward e Brown, 2013). A quimioprevenção pode ter um importante impacto econômico e social reduzindo os índices de incidência e mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil onde a população em geral não possui acesso aos tratamentos, geralmente caros.

O conhecimento de que a quimioprevenção pode interferir nas etapas (iniciação, promoção e progressão) do processo da carcinogênese, permitiu dividir os agentes quimiopreventivos de acordo com os efeitos que possui nessas fases. Eles são classificados como bloqueadores (antimutagênicos) e supressores, alguns dos seus mecanismos estão descritos na Tabela 1. Os bloqueadores agem prevenindo a iniciação

através de vários mecanismos como, por exemplo, a inibição da interação entre o carcinógeno ou radicais livres endógenos e o DNA (Steward e Brown, 2013). Já os supressores, agem inibindo a transformação da célula iniciada em maligna nas fases de promoção e progressão. Alguns agentes naturais presentes em plantas e conhecidos por seus efeitos quimiopreventivos podem ser tanto bloqueadores (antimutagênicos) como supressores (antiproliferativos) e são substâncias encontradas naturalmente em frutas, cereais e diferentes vegetais (Kelloff e Boone, 1994; Park et al., 2003; Surh, 2003; Endringer, 2007).

Tabela 1 – Potenciais mecanismos de agentes quimiopreventivos bloqueadores e supressores.

Potenciais mecanismos	
Bloqueadores de tumor	Supressores de tumor
Atividade antioxidante	Inibição da proliferação celular
Eliminação de radicais livres	Indução de diferenciação
Indução do reparo do DNA	Indução de apoptose em LPN*

Adaptada de Steward e Brown, 2013. * LPN=Lesão pré-neoplásica

3. 2 O uso das plantas como fonte de recursos de agente quimiopreventivos

As plantas representam uma importante fonte de compostos biologicamente ativos (Varanda, 2006; Souza-Moreira et al., 2008). Sua aplicação medicinal data de longos períodos, sendo por muito tempo a única fonte de cura para as enfermidades (Martins et al., 1995; De La Cruz, 2008). Muitos medicamentos têm sido desenvolvidos a partir delas e usados no tratamento de várias doenças incluindo o câncer. São exemplos, os agentes antineoplásicos Vincristina e Vimblastina, isolados do

Catharanthus roseus G. Alguns compostos advindos de plantas podem interagir com o material genético das células promovendo uma atividade antimutagênica, atuando na proteção de macromoléculas, inibindo a transformação maligna de células iniciadas ou retardando o desenvolvimento e progressão de células pré-cancerosas em tumores malignos (Kelloffe e Boone, 1994; De Marini, 1998; Surh, 2003; Park et al., 2003; Serpeloni et al., 2008).

Os fitoquímicos possuem propriedades anticarcinogênicas e antimutagênicas substanciais e são compostos que estão presentes na dieta a base de planta (Surh, 2003). Os compostos como tocóis e tocotrienóis (vitamina E), carotenóides (provitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos como taninos, ácidos fenólicos e flavonoides são exemplos de fitoquímicos com propriedades antioxidantes que estão presentes nos vegetais. Eles podem ser incorporados no organismo através da alimentação (Cerqueira et al., 2007; Ferreira, 2009), atuando como agentes quimiopreventivos com efeitos tanto bloqueadores como supressores na carcinogênese (Duthie et al., 1996; Dusinská et al., 2003; Park et al., 2003).

3. 3 Hepatocarcinogênese – modelo do camundongo jovem

A hepatocarcinogênese apresenta características semelhantes em humanos e roedores, sendo a indução do câncer em roedores considerado um indicador válido de risco de câncer para humanos, não somente para o câncer hepático, mas também para outros órgãos (Feo et al., 2000; Engelbergs et al, 2000; Bannasch et al., 2001; Leender et al., 2008). Assim foram desenvolvidos modelos de hepatocarcinogênese em roedores

em que o potencial carcinogênico de uma substância pode ser detectado pela quantificação de focos de hepatócitos alterados (FHA).

Os FHA precedem a manifestação de neoplasias no fígado, apesar de não serem necessariamente neoplásicos, eles indicam um aumento no risco de desenvolvimento de neoplasias, tanto benignas quanto malignas. A natureza pré-neoplásica dos focos é bem estabelecida e foi demonstrada por vários estudos. Eles são extensivamente estudados em roedores em testes de carcinogenicidade e são observados em diversas espécies, inclusive humanos. Em hepatocarcinogênese experimental os FHA são úteis como biomarcadores de efeitos quimiopreventivos, pois possuem similaridade com os FHA em hepatocarcinogênese humana (Bannasch et al., 1986; 2001; Ito, 2003; Chagas et al., 2011; Kushida et al., 2011). Eles são classificados de acordo com as alterações morfológicas dos hepatócitos sendo: focos de células claras e acidófilas, focos de células basófilas e focos de células mistas (Bannasch e Zerban, 1990; Harada et al.; 1999). Os focos aparecem após a iniciação com carcinógenos e após exposição adicional a carcinógenos ou a outro ambiente promotor (Tatematsu et al., 1983). Estes crescem e tornam-se nódulos que podem ser macroscopicamente visíveis (Tatematsu et al., 1983). Vários químicos carcinogênicos induzem focos de hepatócitos alterados no fígado. A dietilnitrosamina (DEN) é um potente carcinógeno genotóxico e o mais utilizado como agente iniciador em protocolos de hepatocarcinogênese experimental (Leenders et al., 2008). Após ser metabolizada, seus metabólitos reagem com o DNA o que causa mutações que podem iniciar a carcinogênese no fígado (Barbisan et al., 2003). Frequentemente são utilizados camundongos jovens com o fígado em desenvolvimento para a indução de tumores pela DEN (Vesselinovitch et al.; 1984).

No estudo dos mecanismos da hepatocarcinogênese há vários modelos disponíveis, dos quais a maioria envolve as fases de iniciação e promoção onde a proliferação celular é essencial para o desenvolvimento do câncer. Há vários métodos de indução da proliferação celular no fígado. Entre os métodos utilizados, está a hepatectomia parcial em animais adultos, o uso de doses necróticas de um iniciador e o uso de animais neonatais onde a proliferação celular hepática é alta nesta fase inicial (Espandiari et al., 2005; Glauert et al., 2010). A Hepatectomia parcial é um potente indutor mitogênico das células do fígado, porém pode causar dores e altos índices de mortalidade nos animais. Já as doses necróticas podem causar outros efeitos citotóxicos indesejáveis (Ying e Farber, 1980).

No modelo de hepatocarcinogênese com camundongo infantil de Vesselinovitch e Mihailovich (1983), utiliza-se camundongos de 12 a 15 dias de vida onde a proliferação de células hepáticas é utilizada como promotor da formação das lesões pré-neoplásicas (Da Silva, 2008; Leenders et al., 2008). Este estado natural de proliferação celular elimina a necessidade de procedimento cirúrgico adicional, como a hepatectomia parcial. Outra vantagem do modelo é a simplificada forma de iniciação por dose única (Ward et al., 1996).

3. 4 Citoqueratinas CK8/18

Na avaliação do processo de transformação das neoplasias, a expressão de marcadores biológicos tem sido uma ferramenta útil. No modelo de hepatocarcinogênese com camundongos, os focos de hepatócitos alterados (FHA) em

lesões pré-neoplásicas têm validade como marcador biológico nos bioensaios de curta e média duração. No entanto, os FHA mesmo sendo visualizados em coloração por HE, requerem cuidadosos exames histopatológicos podendo ainda pequenos focos não serem percebidos. Portanto, a busca por novos marcadores biológicos é importante.

As citoqueratinas são constituintes do citoesqueleto de células epiteliais. Elas pertencem à classe dos filamentos intermediários, os quais são responsáveis pela estrutura tridimensional das células (Almeida jr, 2004). Estes filamentos são relacionados a uma ampla quantidade de doenças humanas de acordo com sua diversidade e distribuição nos tecidos, por exemplo, doenças do fígado (Omary et al.; 2002). As citoqueratinas 8/18 estão presentes nas células dos ductos biliares e são as únicas presentes nos hepatócitos adultos. Elas são consideradas as proteínas do estresse de hepatócitos, devido sua indução após injúria no fígado. Em estudos realizados por Kakehashi et al (2010) e Kushida et al (2011) as citoqueratinas CK8/18 foram positivas em marcações por imuno-histoquímica em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em fígado de camundongos. Segundo Kakehashi et al. (2010), a CK8/18 foi positivamente reconhecida por imuno-histoquímica em todos os FHA basofílicos, assim como em todos os tumores hepatocelulares em camundongos B6C3F1 e C57BL/6J (Kushida et al., 2011). Neste trabalho a CK8/18 foi utilizada como marcador de estresse celular.

3. 5 Parâmetros enzimáticos da função hepática

O fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação e eliminação de compostos químicos e possui a mais importante classe de enzimas de biotransformação. Alguns compostos hepatotóxicos ao serem metabolizados podem afetar alguns

parâmetros da função hepática e podem ser avaliados por testes de enzimas específicas. A enzima intracelular Aspartato aminotransferase (AST) é liberada no sangue em proporção ao dano celular sofrido e indica um dano celular mais profundo. A Alanina aminotransferase (ALT) também é um indicador de lesão, específica e sensível à necrose hepática aguda. A mensuração dos níveis séricos dessas enzimas, indicadoras de injúria ou propriedades protetoras, é utilizada para auxiliar na avaliação de agentes quimiopreventivos.

3. 6 A espécie *Caryocar brasiliense* – Pequi

O Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma árvore nativa do Cerrado brasileiro e está entre as seis mais importantes espécies desta região (Mariano-Da-Silva et al., 2009). A espécie *C. brasiliense* pertencente à família Caryocaraceae, distribuída em estados como Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Pará e alguns estados nordestinos, sendo consumido pela população destes estados (Damiani, 2006; Kerr et al., 2007). Na medicina popular o Pequi é utilizado para o tratamento de doenças bronquio-respiratórias e problemas oftalmológicos (Almeida e Silva, 1994) e o óleo da polpa é tradicionalmente usado como agente tônico devido à presença de antioxidantes naturais (Mariano-da-Silva et al., 2009).

A polpa de *C. brasiliense* é rica em lipídios (33,4%), possuindo um considerável teor de proteína. Na composição da polpa e do óleo da polpa, verifica-se a presença de diversos ácidos graxos como o palmítico, oléico, palmitoléico, esteárico, linoléico e linolênico (Facioli e Gonçalves, 1997; Lima et al., 2007). É uma fruta que possui alto

teor de vitaminas B1 e B2 (Oliveira et al., 2006) e vitamina C com 78,3 mg/100g (Almeida et al., 1998; Mariano-da-Silva et al. 2009). Na sua composição ainda são encontrados carotenóides como β -caroteno, licopeno (Oliveira et al., 2006), ζ -caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina e mutatoxantina (Ramos et al., 2001; Oliveira et al., 2006). A este grupo de compostos é atribuída a propriedade antioxidante que está relacionada com a intensificação do sistema imunológico e a redução do risco de doenças degenerativas como o câncer, entre outras (Britton, 1995; Rodriguez-Amaya, 1997; Ramos et al., 2001). Eles podem evitar efeitos mutagênicos e carcinogênicos bem como diminuir os níveis de danos oxidativos no DNA (Duthie et al., 1996; Dusinská et al., 2003; Park et al., 2003).

Figura 1 – Fruto do pequi, Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Foto de José Antônio da Silva. Fonte: Revista de Biotecnologia ciência & Tecnologia

Lima e Mancini-Filho (2005) na avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso e das frações de ácidos fenólicos da polpa do Pequi evidenciaram proteção contra os danos oxidativos comparados ao padrão comercial butilidroxitolueno (BHT). Já Khouri et al. (2007), demonstraram que o extrato aquoso da polpa de *C. brasiliense* pode prevenir aberrações cromossômicas induzidas por bleomicina na medula óssea de camundongos. O estudo ainda mostrou que o extrato aquoso protegeu as células da cultura de células CHO-K1 contra o efeito clastogênico de ciclosfosfamida. Em outros estudos realizados por Miranda-Vilela et al.; (2009; 2011) o óleo de Pequi administrado a atletas (corredores) reduziu a peroxidação lipídica no plasma, danos no DNA e injúrias no tecido. Também apresentou atividade anti-inflamatória e reduziu significativamente o colesterol total e o LDL nos atletas.

Métodos

4 Métodos

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, registrados com os respectivos números 2402/2011 e 061/12.

4.1 Preparo e análise química do óleo do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb)

O óleo de *Caryocar brasiliense* foi cedido pelo Dr. César K. Grisolia da Universidade de Brasília – UnB. Após ser extraído a frio através de prensa mecânica da polpa do pequi fresco, o óleo foi filtrado a vácuo e acondicionado em frasco âmbar sob refrigeração. Para a verificação qualitativa dos ácidos graxos saturados, insaturados e carotenóides, tabela 2 (Miranda-Vilela et al., 2011), foi realizada a análise química do óleo de Pequi na Central Analítica no Instituto de Química – USP. Para a análise foi utilizado o método de Cromatografia Gasosa, em coluna BPX5 5% fenil polisilfenileno.

4.2 Ensaio inicial

Foi realizado um ensaio (figura 2) com duração de 14 dias para avaliação da viabilidade das concentrações das doses do óleo de Pequi. Foram utilizados 10 camundongos Balb/c machos de 30 dias de vida, criados e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ – USP. Os animais foram divididos em dois grupos: 1) dose 100mg (n=5); 2) dose 400mg (n=5) e; 3). Ao fim do período houve a

eutanásia dos animais e ocorreu a necropsia para estudo de lesões macroscópicas e estudo histopatológico do fígado e do estômago.

Tabela 2 – Composição relativa do óleo da polpa de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Adaptada de Miranda-Vilela et al. (2011).

Ácidos graxos¹		Vitaminas²	Carotenóides³
Saturados (%)	Insaturados (%)	Tipos (mg/100g)	
Palmítico (41,78)	Oleico (54,28)	Vitamina C (78,3)	Pró-vitamina A (6,26 – 11,5)
Esteárico (1,28)	Palmitoleico (0,67)	Vitamina E (0,607)	Licopeno (1,12 – 2,08)
Araquídico (0,12)	Linoleico (1,36)		
	Linolênico (0,51)		
Total (43,18)	Total (56,88)	Total (78,9)	Total (6,75 – 28,66)

³ Ramos et al., 2001; ³ Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004; ³ Oliveira et al., 2006; ³ Lima et al., 2007; ¹ Miranda-Vilela et al., 2009; ² Almeida et al., 1988; ² Enes et al., 2011.

4. 3 Animais e ambiente de experimentação

Foram utilizados 59 camundongos Balb/c machos com 14 dias de vida, pesando em média 10g, criados e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais permaneceram em gaiolas de policarbonato de tamanho (20x32) com no

máximo 5 animais por caixas, tendo livre acesso a ração (NUVILAB CR1[®]) e água *ad-libitum*. A temperatura da sala de manutenção foi de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 45 - 65% em ciclo de luz de 12 horas claro/escuro além de exaustão contínua do ar ambiente. Os procedimentos foram de acordo com as normas de proteção aos animais do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

4. 4 Modelo de hepatocarcinogênese

Foi utilizado o “modelo de camundongo infantil” original de Vesselinovitch e Mihailovich (1983) modificado por Da Silva (2008). O carcinógeno DEN (Sigma, diluído em solução salina 0,9%) foi utilizado como iniciador, injetado por via intraperitoneal em uma única aplicação na concentração de 10 $\mu\text{g/g}$ em camundongos de 14 dias de idade.

4. 5 Delineamento experimental

A dietilnitrosamina (DEN) fornecida pelo fabricante na concentração de 1g/mL foi diluída em salina tendo como concentração final 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Os animais com 14 dias de vida receberam 100 μL de solução salina (0.9%) por via intraperitoneal injetados com agulhas ultra-fine (12.7 mm X 0,33 mm) em seringas de insulina U-100. Todo o material contaminado foi devidamente descartado. Os animais pertencentes aos grupos Controles receberam apenas solução salina (0.9%).

Após 21 dias de vida, todos os animais foram desmamados, pesados e identificados com tinta Henna[®] (Surya HENNA do Brasil) e alocados em 5 grupos, figura 2. DEN (dietilnitrosamina 10µg/g); OP400 (400 mg/kg); DEN+OP100 (dietilnitrosamina 10µg/g + 100 mg/kg de óleo de Pequi); DEN+OP400 (dietilnitrosamina 10µg/g + 400 mg/kg de óleo de Pequi); e Controle. No 30º dia de vida os camundongos dos grupos tratamentos OP400, DEN+OP100 e DEN+OP400 (400 mg/kg, 100 e 400mg/kg, respectivamente) receberam óleo do Pequi administrado oralmente com auxílio de uma micropipeta uma vez ao dia, até o 189º dia. A concentração de 100mg e 400mg/kg, foi conforme os resultados obtidos no experimento de avaliação da viabilidade das concentrações das doses do óleo de pequi. Os demais animais receberam solução salina a 0.9%.

O acompanhamento da evolução do ganho de peso dos animais e consumo de ração foi feito por meio de pesagens semanais. Para cálculo da dose a ser administrada nos grupos tratados com a substância teste eram feitas três pesagens semanais.

Figura 2 – Delineamento experimental 27 semanas – Focos de hepatócitos alterados (FHA). C (Controle); DEN (dietilnitrosamina 10µg/g); OP400 (400 mg/kg de óleo de Pequi); DEN+OP100 (dietilnitrosamina 10µg/g + 100 mg/kg de óleo de Pequi); DEN+OP400 (dietilnitrosamina 10µg/g + 400 mg/kg de óleo de Pequi).

4. 6 Eutanásia dos animais e coleta de material

Ao fim do experimento todos os animais foram anestesiados por um sistema de anestesia inalatória, onde a droga utilizada (isoflurano, Cristália®) foi vaporizada em oxigênio 100%, e fornecida aos animais através de uma máscara. Amostras do sangue foram coletadas por punção cardíaca para realização de análise bioquímica. Para a efetivação da eutanásia, a concentração relativa do anestésico foi progressivamente aumentada no ar fornecido ao animal até que sobreveio a parada respiratória e cardíaca. O fígado foi colhido e pesado e obteve-se o índice hepatossomático, que é a

divisão do peso do fígado pelo peso do animal multiplicado por cem. Para o cálculo de ganho de peso foi subtraído o peso inicial do peso final do animal. Após obtenção desses cálculos o fígado foi fixado em formaldeído a 4% obtido a partir de paraformaldeído 4% e metacarn por 24 e 12 horas respectivamente. Também foram coletados em nitrogênio líquido amostras de cada lobo dos fígados de todos os animais. Esse material foi armazenado em freezer – 40°C.

4. 7 Análise bioquímica

As amostras de sangue coletadas e armazenadas sem anticoagulante foram centrifugadas a 850 G por 10 minutos em centrífuga (Hermle Labortochinik GmbH, Z326K, Alemanha) para obtenção do soro, que foram mantidos em freezer (-40°C) até o momento da análise bioquímica. A análise bioquímica do soro foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP, para obtenção das concentrações de ALT e AST. A análise foi realizada em analisador bioquímico automático (Labtest/Tokyo Boeki 240, Japão) e os kits utilizados foram os seguintes: Alanina aminotransferase (ALT) da Biosystems (cod. 11533) método enzimático; Aspartato aminotransferase (AST) da Biosystems (cod. 11531) método enzimático. Os resultados foram expressos em U/L na temperatura de 25°C.

4. 8 Processamento do material para avaliação histopatológica

Foram colhidos fragmentos aleatórios de todos os lobos hepáticos (esquerdo, mediano, caudado, anterior e posterior direito) e foram fixadas em formaldeído a 4% obtido a partir de paraformaldeído 4% e solução fixadora Metacarn, devidamente identificados conforme numeração dos animais e subsequentemente processados para inclusão em Paraplast. Cada bloco foi feito com amostras de todos os lobos de um animal, sendo um bloco para cada fixador. Apenas os blocos do material fixado em formaldeído a 4% foram utilizados para confecção das lâminas. Cortes não seriados de 4,5 µm foram utilizados para confecção de lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE), azul de toluidina e as confeccionadas para as reações de imuno-histoquímica. Os cortes corados em (HE), azul de toluidina e das reações de imuno-histoquímica foram fotografados em microscópio óptico BX60.

4. 8. 1 Avaliação histopatológica

As lâminas coradas por (HE) foram examinadas em microscopia de luz para identificação das lesões hepáticas pré-neoplásicas dos tipos basófilas, eosinófilas ou acidófilas, células claras, vacuoladas ou mistas e adenomas (Harada et al., 1999). O material corado em azul de toluidina foi utilizado para melhor identificação de pequenas lesões dos tipos basófilas.

4. 8. 2 Estudo estereológico

Volume do fígado ($V_{\text{fígado}}$)

A massa (ou peso fresco) do fígado em gramas foi convertida em volume (cm^3) dividindo-se a massa do órgão (M) pela densidade específica do fígado ($d = 1,08 \text{ g/cm}^3$) (Guerra, 2006; Silva, 2011). A seguinte fórmula foi utilizada:

$$V_{\text{fígado}} = \frac{M}{d}$$

Densidade do volume (V_v) da lesão pré-neoplásica

A densidade de volume (V_v) refere-se a fração de volume ocupada pela lesão pré-neoplásica no fígado. Para a estimativa de V_v um sistema teste foi sobreposto sobre o espaço referência (parênquima do fígado). Foram contados o número total de pontos sobre a região de interesse (lesão pré-neoplásica - P_{int}) e o número total de pontos sobre o espaço referência (parênquima do fígado - P_{ref}), (figura 3). A seguinte equação foi utilizada:

$$V_v := \frac{\sum P_{\text{int}}}{\sum P_{\text{ref}}}$$

A densidade de volume vai de 0 a 1, mas pode ser expressa como percentagem (Santos *et al.*, 2014; Novaes *et al.*, 2013; Cupertino *et al.*, 2013).

Figura 3 – Sistema teste - contagem de pontos sobre a lesão e o parênquima do fígado para determinar a densidade de volume da lesão (V_v).

Volume Total (V_{TOT}) da lesão pré-neoplásica

O volume total das lesões pré-neoplásicas foi estimado pela multiplicação da densidade de volume (V_v) da lesão pré-neoplásica pelo volume do fígado ($V_{fígado}$) (Marcos et al, 2012; Howard and Reed 2010).

$$V_{tot} := V_v \times V_{fígado}$$

4. 8. 3 Imuno-histoquímica para CK8/18

Os cortes de tecidos fixados em formaldeído 4% foram utilizados na reação de imuno-histoquímica. Como anticorpo primário foi utilizado o CK8/18, policlonal de cobaia, (diluição 1:200; Lifespan BioSciences, Seattle, WA) . Após a desparafinização, a recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH 6,0), 95°C por 10 minutos, seguida da incubação com peróxido de hidrogênio à 10% por 30 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Após o bloqueio de reações inespecíficas com leite em pó desnatado (Molico) a 5% diluído em tampão Tris – HCl (pH 7,5) a 60°C – 1 h, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário em câmara úmida *overnight*. No segundo dia as lâminas foram lavadas com tampão Tris-HCl, em seguida reveladas pelo secundário biotilado anti-cobaia suprido com o kit Vectastain ABC pelo método ABC (Vectastain ABC Kit [guinea pig IgG]; Vector Laboratories). A visualização dos antígenos foi realizada com a diaminobenzidina 3,30-tetrahidrocloro, desidratadas e seguida montagem das lâminas. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico Olympus BX60 para a verificação de positividade de CK8/18 nas lesões e caracterização destas lesões.

4. 9 Analises estatística

Os resultados referentes a densidade de volume, volume e volume total das lesões, foram expressos como médias seguidas de seus respectivos coeficientes de variação observados (CV_{obs}), onde (CV_{obs}) representa o quociente entre o desvio padrão

e a média. A análise estatística foi conduzida com o auxílio do software estatístico Minitab 16 (2010) e levando-se em conta os princípios de amostragem sistemática e uniformemente aleatória (SURS) (Gundersen *et al.*, 1999). Diferenças entre grupos foram consideradas significantes quando ($p \leq 0,05$). Os dados referentes ao índice hepatossomático, peso corpóreo final e ganho de peso total foram analisadas pelo teste de análise de variância One Way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey-Kramer que comparou todos os grupos entre si. Para estas análises foi utilizado o Software InStat, (Califórnia, EUA).

Resultados

5 Resultados

Na avaliação de lesões macroscópicas e estudo histopatológico do fígado e estômago dos animais tratados no ensaio inicial (figura 2), não foram observadas alterações. A análise química qualitativa do óleo de Pequi realizada na Central Analítica no Instituto de Química – USP identificou a presença das substâncias analisadas: ácidos graxos saturados, insaturados e carotenóides.

5.1 Observações gerais

Não houve óbito nos animais durante o período experimental. Os pesos corpóreos finais e o ganho de peso total não apresentaram diferenças entre os grupos. Os grupos DEN e DEN+OP400 apresentaram um aumento de 24% no peso dos fígados quando comparados ao Controle e ao grupo OP400. O índice hepatossomático também aumentou 20% nos grupos DEN, DEN+OP100 e DEN+OP400 também comparados aos grupos Controle e OP400. Os dados referentes às médias, desvio padrão e o valor de p destes parâmetros estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Peso corpóreo final, ganho de peso, peso do fígado e índice hepatossomático dos grupos experimentais – São Paulo, 2014.

Grupos	Nº animais	Peso corpóreo final (g) ^{NS}	Ganho de peso (g) ^{NS}	Peso do fígado (g) [*]	IHS (%) [*]
Controle	5	32.0±1.6	17.1±0.6	1,29±0.11 ^b	4.02±0.18 ^b
OP400	5	31.0±1.0	16.8±1.2	1,30±0.08 ^b	4.21±0.23 ^b
DEN	11	31.9±1.9	16.6±2.6	1,61±0.20 ^a	5.00±0.74 ^a
DEN+OP100	13	31.9±2.4	16.5±1.8	1,55±0.18 ^{ab}	4.86±0.29 ^a
DEN+OP400	15	33.6±2.1	16.8±2.7	1,70±0.18 ^a	5.06±0.38 ^a
Aumento (%)		-	-	24%	20%

Dados apresentados como médias±DP – C (controle); OP400 (óleo de pequi 400 mg/kg); DEN (dietilnitrosamina 10µg/g) ; DEN+OP100 (dietilnitrosamina + 100 mg/kg de óleo de pequi); DEN+OP400 (dietilnitrosamina + 400 mg/kg de óleo de pequi); IHS = índice hepatossomático; * p=0,001.

5. 2 Histopatologia

No exame histopatológico foram observadas alterações como infiltrado inflamatório e áreas de necroses focais e de coagulação nos grupos DEN, DEN+OP100 e DEN+OP400. Nestes grupos os focos de hepatócitos alterados (FHA) pré-neoplásicos observados foram dos tipos focos basófilos, focos eosinófilos/acidófilos, adenomas de células basofílicas e claras (figura 4). No entanto, 98,33% dos perfis das áreas das lesões observadas foram de FHA basófilos. Nos grupos DEN e DEN+OP100, 100% dos animais apresentaram lesões pré-neoplásicas. Já o grupo DEN+OP400 apenas 80% dos

animais apresentou algum tipo de lesão pré-neoplásica. Lesões pré-neoplásicas em remodelação (figura 5) também foram observadas em todos os grupos. Porém no grupo DEN+OP400, 40% dos perfis das áreas das LPN observadas foram de LPN em remodelação, com um aumento de 136,19% em relação aos grupos DEN. As médias e os valores de p estão representados na tabela 4. A coloração por azul de toluidina foi positiva para focos de hepatócitos alterados do tipo basófilos e adenomas de células basofílicas e possibilitou a visualização das pequenas lesões.

Tabela 4 – Índice de lesões pré-neoplásicas em remodelação dos grupos tratados com DEN e DEN + óleo de pequi. São Paulo. 2014.

Grupo	Nº de animais com LPN	% LPN em remodelação do total de LPN observadas
DEN	11/11	17.57±15.2 ^a
DEN+OP100	13/13	29.43±13.8 ^{ab}
DEN+OP400	12/15	41.5±15.4 ^b
Aumento %	-	136,19*

Dados apresentados como Média±DP dos grupos tratados com DEN e DEN+ óleo de pequi. DEN (dietilnitrosamina 10µg/g); DEN+OP100 (dietilnitrosamina 10µg/g + óleo de pequi); DEN+OP400 (dietilnitrosamina 10µg/g + óleo de pequi); As médias assinaladas com uma mesma letra não diferem entre si estatisticamente. p= 0,005. LPN = lesões pré-neoplásicas. * Aumento no percentual de LPN em remodelação de DEN+OP400 em comparação com o grupo DEN.

Figura 4 – Tipos de lesões observadas nos grupos DEN, DEN+OP100 e DEN+OP400.

(A) Foco eosinófilo/acidófilo; (B) Adenoma de células claras; (C) Adenoma de células basofílicas; (D) Um pequeno FHA basófilo. Coloração por hematoxilina eosina (HE).

Figura 5 – Lesões pré-neoplásicas em remodelação (A) e persistente (B) em fígado de camundongos tratados com DEN + óleo de pequi. Objetiva de 20 x. Coloração em azul de toluidina.

5.3 Análise estereológica do fígado

O tratamento com o óleo de Pequi na concentração de 400 mg/kg reduziu o volume total das lesões e a densidade de volume das lesões em 51% nos fígados dos camundongos. No grupo que recebeu 100 mg/ kg do óleo (DEN+OP100), não houve redução significativa nestes mesmos parâmetros. Os volumes dos fígados nos grupos DEN, DEN+OP100 E DEN+OP400, também não apresentaram diferenças significantes. Os dados das médias e coeficiente de variação destes parâmetros citados a cima, estão representados na tabela 5 e figuras 6 e 7.

Tabela 5 - Parâmetros estereológicos do fígado. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo seguida do desvio padrão (DP) e seu coeficiente de variação (CV) entre parênteses - São Paulo- 2014.

Parâmetros Estereológicos		Grupos		
		DEN	DEN+OP100	DEN+OP400
Volumes	Volume do Fígado (cm³)^{NS}	1,51±0,21 (0,14) ^a	1,40±0,14 (0,10) ^a	1,55±0,10 (0,06) ^a
	Densidade de volume da lesão pré- neoplásica (Vv)*	0,04±0,02 (0,56) ^a	0,03±0,01 (0,31) ^{ab}	0,02±0,009 (0,46) ^b
	Volume total ocupado pelas lesões pré-neoplásicas (Vtot) (cm³)**	0,06±0,04 (0,61) ^a	0,04±0,01 (0,30) ^{ab}	0,03±0,01 (0,47) ^b

Animais tratados com DEN 10µg/g; óleo de pequi 400 mg/kg e 100mg/kg. DEN+OP100 (dietilnitrosamina + 100 mg de óleo de pequi); DEN+OP400 (dietilnitrosamina + 400 mg de óleo de pequi); As médias assinaladas com uma mesma letra não diferem entre si estatisticamente. NS= não significativo ^{NS}p=0,137; *p=0,017; **p=0,023.

Figura 6 – Gráfico representativo do volume total (V_{tot}) das lesões pré-neoplásicas (LPN) do fígado de camundongo nos diferentes grupos de estudo (DEN- dietilnitrosamina 10 μ g/g; DEN+OP100- dietilnitrosamina + 100 mg/kg de óleo de pequi; DEN+OP400- dietilnitrosamina + 400 mg/kg de óleo de pequi). As diferenças foram significantes entre os grupos DEN e DEN+OP400 (* $p= 0,023$). Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais representam as médias de cada grupo.

Figura 7 – Gráfico representativo da densidade de volume (Vv) das lesões pré-neoplásicas (LPN) do fígado de camundongo nos diferentes grupos de estudo (DEN- dietilnitrosamina 10 μ g/g; DEN+OP100- dietilnitrosamina + 100 mg/kg de óleo de pequi; DEN+OP400- dietilnitrosamina + 400 mg/kg de óleo de pequi). As diferenças foram significantes entre os grupos DEN e DEN400 (*p= 0,017). Os triângulos representam os valores individuais e as barras horizontais representam as médias de cada grupo.

5. 4 Bioquímica do soro

A análise bioquímica realizada para determinar as concentrações de ALT e AST no sangue dos animais tratados e não tratados mostrou que os níveis dessas enzimas não foram alterados pelo tratamento ($p < 0,05$), tabela 6.

Tabela 6 – Determinação dos níveis de ALT e AST no soro dos animais tratados e não tratados com óleo de pequi. São Paulo, 2014.

Grupos	(n)	ALT*	AST**
Controle	5	15.82±1.44	30.15±5.66
OP400	5	18.87±1.99	49,45±20.44
DEN	5	21.72±1.99	47.67±9.17
DEN+OP100	5	23.69±1.35	50.07±13.09
DEN+OP400	5	18.87±7.26	43.10±2.57

Valores de médias±DP – C (Controle); OP400 (óleo de pequi 400 mg/kg); DEN 10µg/g; DEN+OP100 (dietilnitrosamina + 100 mg de óleo de pequi); DEN+OP400 (dietilnitrosamina + 400 mg de óleo de pequi). * $p=0,064$; ** $p=0,160$.

5. 5 Imuno-histoquímica para CK8/18

Foram realizadas reações de imuno-histoquímica para CK8/18. Houve positividade nos ductos biliares de todos os animais examinados. Focos do tipo basófilos e os adenomas de células basofílicas foram positivos para CK8/18 (Figura 8) apesar de alguns focos não apresentarem marcação. Observou-se uma diminuição no número de áreas de perfis de FHA positivos para CK8/18 no grupo DEN+OP400.

Figura 8 – Imuno-histoquímica de focos basófilos e adenoma de células basofílicas em fígado de camundongos Balb/c tratados com dietilnitrosamina. (A e B) adenoma de células basofílicas e (B e C) FHA basófilo. (A e C) coloração de HE. (B e D) imuno-histoquímica para CK8/18.

Discussão

6 Discussão

Neste estudo nós avaliamos o efeito quimiopreventivo de *Caryocar brasiliense* na hepatocarcinogênese induzida pela dietilnitrosamina em camundongos. O óleo de pequi mostrou-se quimiopreventivo na dosagem de 400 mg/kg, pois reduziu o volume total das lesões pré-neoplásicas nos fígados dos animais e o número total de animais acometidos com estas lesões. Também reduziu o número de lesões pré-neoplásicas (LPN) persistentes que são consideradas percussoras de hepatocarcinomas (Tatematsu et al. 1983).

Estudos conduzido por Miranda-Vilela et al. (2008) com o óleo de *C. brasiliense* diminuíram danos oxidativos celulares e o efeito foi relacionado ao seu conteúdo rico em substâncias antioxidantes. Em nosso estudo, os efeitos quimiopreventivos de *C. brasiliense* observados na hepatocarcinogênese também foram atribuídos à atividade antioxidante das substâncias presente no óleo, entre elas os carotenóides como o β -caroteno (uma pró vitamina A) e licopeno (Oliveira et al., 2006), entre outros e vitamina C (Almeida et al., 1998). Estes compostos são inibidores de estresse oxidativo, processo em que algumas substâncias químicas dão início ou promovem as neoplasias no fígado (Glauert et al., 2010; Nuno et al. 2014). Vários estudos têm evidenciado os efeitos quimiopreventivo destes compostos na hepatocarcinogênese (Gradelet et al., 1998; Moreno et al., 2002; Toledo et al., 2003; Ambrogi et al., 2005).

Alguns estudos com fitoquímicos, inclusive os que estão presentes no óleo de Pequi, quando isolados obtiveram resultados nulos ou mesmo negativos na prevenção do câncer (Cerqueira et al., 2007; Tharappel et al., 2008). Porém neste estudo utilizamos o extrato oleoso do produto bruto (fruto) com um conteúdo onde há vários compostos

bioativos que possivelmente atuaram em sinergismo e que pode explicar a diferença destes resultados com estudos onde a substância foi testada isoladamente. Estudos com fitoquímicos tem mostrado que a combinação entre eles pode ser mais efetiva contra neoplasias que o composto individual (Tharappel et al., 2008). Segundo Cerqueira et al. (2007) frutas e hortaliças tem apresentado resultados mais significativos na prevenção de doenças do que substâncias isoladas, pois os alimentos possuem vários compostos que agem de forma cooperativa. Sendo o caso dos antioxidantes que agem em sinergismo, assim como a vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) e vitamina C (ácido ascórbico), onde a vitamina C participa da regeneração do α -tocoferol (uma isoforma da vitamina E), conferindo-lhe novamente o potencial antioxidante (Zhang e Omaye, 2001). Os resultados observados com o óleo de *C. brasiliense* na hepatocarcinogênese estão de acordo com as afirmações anteriores e demonstram a importância da utilização deste composto na forma integral onde há a presença de várias substâncias bioativas que possivelmente atuaram em sinergismos potencializando os efeitos benéficos destas substâncias. Também nossos resultados sugerem que a administração dos fitoquímicos de forma isolada possivelmente não seja a melhor estratégia para a utilização destas substâncias na prevenção do câncer.

O tratamento com o óleo de Pequi na dose de 400 mg/kg reduziu em 20% o número total de animais com focos de hepatócitos alterados (FHA). As substâncias antioxidantes atuam como agentes bloqueadores da carcinogênese (Surh, 2003; Steward et al. 2013). Eles evitam danos no DNA, inibindo a ativação de pró-carcinógenos e induzindo sua destoxificação. Também induzem o sistema de reparo da molécula de DNA (Steward et al., 2013). Este efeito foi observado em estudos com licopeno, β -caroteno e cantaxantina em que estes compostos protegeram o DNA de instabilidade,

resultando em efeito quimiopreventivo na hepatocarcinogênese (Gradelet et al., 1998; Toledo et al., 2003; Ambrogi et al., 2005). Assim, este efeito indica que os compostos antioxidantes presentes no óleo possivelmente atuam no metabolismo do carcinógeno, evidenciando o potencial do óleo de Pequi como agente bloqueador na hepatocarcinogênese.

O óleo de Pequi inibiu o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas (LPN) no grupo que recebeu a maior dose de óleo de Pequi (DEN+OP400). A redução de 51% no volume total das LPN pode estar relacionada à inibição da proliferação celular. Sabemos que os compostos com atividade antioxidante contribuem para a prevenção não apenas na fase de iniciação, mas também nas fases de promoção ou progressão de células iniciadas (Kelloff et al., 1994; Steward et al., 2013). As substâncias que atuam na fase de promoção, denominados de agentes supressores, agem em geral, inibindo a proliferação das células iniciadas e/ou induzindo apoptose (Surh, 2003; Steward et al., 2013). Assim, as substâncias carotenóides com atividade pró-vitamina A e licopeno, presentes no óleo de Pequi que acreditamos estarem envolvidas no efeito hepatoprotetor contras as lesões pré-neoplásicas, possivelmente atuaram de forma mais efetiva na interferência destes processos durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese, devido o desenho experimental deste estudo.

Apesar de não termos avaliado tais parâmetros, alguns autores já demonstraram que os efeitos quimiopreventivos de alguns carotenóides e da vitamina C, foram devido à interferência na proliferação e/ou apoptose. Gloria et al. (2014) em estudo com β -caroteno e o licopeno relataram que estes compostos inibiram a proliferação celular, aumentaram a apoptose e pararam o ciclo celular em diferentes fases em linhagens de células de câncer de mama humano. A vitamina C, um antioxidante eficaz (Zhang e

Omaye, 2001) também foi capaz de alterar a expressão de genes na apoptose quando avaliada em culturas de células (Cerqueira et. al., 2007).

Em estudos *in vivo*, β -caroteno foi quimiopreventivo nas diferentes fases da hepatocarcinogênese em ratos e os resultados foram relacionados à diminuição da proliferação celular (Moreno et al.,2002; Ambrogi et al., 2005; Fonseca et al.,2005). O β -ionona, um sesquiterpeno presente na estrutura molecular de carotenóides como o β -caroteno, no retinol e no ácido retinóico (Scolastici et al.,2014), também apresentou efeitos quimiopreventivos na fase de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese. Segundo os autores, os efeitos foram resultantes da inibição da proliferação celular (Espindola et al., 2005; Cardozo et al., 2011) e indução de apoptose (Cardozo et al.,2011).

Dessa forma, a redução das LPN evidencia que o óleo de *C. brasiliense* possui efeitos inibitórios na promoção de lesões hepáticas pré-neoplásicas, possivelmente inibindo a proliferação celular e, portanto, um potencial agente supressor na hepatocarcinogênese.

O tratamento com o óleo de Pequi na dose de 400 mg/kg (DEN+OP400) também aumentou o percentual (136,19%) de lesões pré-neoplásicas em remodelação nos fígados dos camundongos, sugerindo que o óleo induz este processo. A remodelação é o processo pelo qual o hepatócito perde gradualmente alguns marcadores pré-neoplásicos, retornando ao fenótipo normal do fígado (Tatematsu et al., 1983; Mazzantini et al., 2008). Alguns desses focos apresentam menor capacidade de crescimento e sofrem remodelação para uma aparência de fígado normal. Os que persistem, proliferam e podem progredir para uma neoplasia. Nas LPN em remodelação os hepatócitos misturam-se com os do parênquima circunjacente, tornando suas delimitações menos

definidas, diferente das LPN persistentes onde as delimitações são nítidas em toda sua extensão (Mazzantini et al., 2008).

Informações sobre o processo de remodelação e persistência das LPN são escassos. No entanto, supõe-se que a rediferenciação dos hepatócitos para um fenótipo semelhante ao do fígado normal ou mesmo morte celular possa estar envolvida na remodelação das LPN (Feo et al. 2006; Cardozo et al., 2011). Assim, o bloqueio na diferenciação celular e apoptose podem estar relacionados com a maior tendência de evolução a um carcinoma hepatocelular (Fonseca et al., 2005; Cardozo et al., 2011). Rizzi et al (1997) e Ambrogi et al (2005) na avaliação do potencial quimiopreventivo do β -caroteno, atribuíram o efeito protetor deste carotenóide na hepatocarcinogênese não apenas a inibição de lesões persistentes mas também pela atividade de estimulação de lesões GST-positivas em remodelação. O tratamento de ratos Wistar com β -Ionona durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese também aumentou o número de LPN em remodelação, inibindo assim as lesões pré-neoplásicas com fenótipo de maior agressividade, resultando em efeito quimiopreventivo na hepatocarcinogênese (Scolastici et al., 2014). Portanto, a indução do processo de remodelação das lesões pré-neoplásicas foi um dos mecanismos pelo qual o óleo de pequi exerceu seus efeitos quimiopreventivos neste estudo, reforçando-o como promissor agente preventivo contra o câncer hepático.

Nas avaliações histopatológicas foram visualizadas alterações como infiltrado inflamatório e áreas de necroses nos grupos DEN, DEN+OP100 e DEN+OP400, estando ausentes nos grupos OP400 e Controle. De acordo com Harada et al. (1999) camundongos tratados com drogas hepatotóxicas podem apresentar estes tipos de lesões. Em estudos realizado por Nuno et al., (2014) com camundongos expostos a

DEN, foi observado necrose multifocais e outras alterações. Neste estudo concluímos que as lesões são o resultado do tratamento com o carcinógeno dietilnitrosamina (DEN), visto que estas lesões não foram observadas nos grupos OP400 e Controle.

Os focos de hepatócitos alterados (FHA) observados neste estudo foram dos tipos basófilos, eosinófilo e adenomas de células claras e basofílicas (Figura 4). No entanto, 98,33% das lesões pré-neoplásicas foram de células basofílicas, possivelmente devido o tratamento com o carcinógeno dietilnitrosamina, a linhagem de camundongos e o modelo de hepatocarcinogênese escolhido. Os focos basófilos consistem de hepatócitos com aumentado basofilia citoplasmática devido à presença de ribossomos livres ou retículo endoplasmático. Eles são induzidos por carcinógenos que reagem com o DNA, como a dietilnitrosamina, e aumentam em número e/ou tamanho com o tempo (Harada et al.; 1999; Lee 2000). Kakehashi et al.(2010) em estudo com camundongos B6C3F1 e C57Bl/6J, ambos com 14 dias de vida (período pré desmame), induzidos com dietilnitrosamina (DEN 10 mg/kg) após 38 semanas encontraram lesões de células basofílicas na proporção de 97,5% e 100% respectivamente, do total de lesões observadas. Enquanto Kushida et al. (2011) encontraram após 8 semanas da indução com DEN focos de células basófilas, claras e eosinófilas. No entanto, estes últimos autores induziram os camundongos C57BL/6 com a idade de 4 semanas (período pós desmame). Portanto, acreditamos que estes resultados parecidos a de Kakehashi et al.(2010), se devem ao fato de utilizarmos o mesmo modelo e forma de iniciação no período pré-desmame, reforçando a conclusão de Kushida et al. (2011) que sugere que a forma de iniciação dos animais no período pré ou pós-desmame influencia nestes resultados. Também a linhagem parece influenciar neste aspecto. A linhagem BALB/c foi escolhida para ser utilizada no modelo de hepatocarcinogênese do camundongo

jovem. Todos os animais do grupo tratado apenas com o carcinógeno (DEN) apresentaram focos de hepatócitos alterados, enquanto os grupos Controle e OP400 (tratado apenas com 400 mg/kg de óleo de pequi) não apresentaram estas lesões. A escolha da linhagem do animal é importante para estudos dessa natureza, sendo essencial que a linhagem apresente sensibilidade ao carcinógeno e baixa incidência de lesões espontâneas. Este resultado confirma os dados da literatura onde camundongos dessa linhagem são considerados adequados para estudos de carcinogenicidade por apresentarem baixa incidência de tumores espontâneos no fígado, enquanto é sensível a indução de tumores hepáticos por carcinógenos químicos (Lipsky et al., 1981). Dessa forma, a linhagem que escolhemos, foi adequada porque em nosso experimento, os animais controle não apresentaram lesões pré-neoplásicas ou tumores hepáticos espontâneos, assim podemos ter certeza que as lesões pré-neoplásicas que surgiram nos animais tratados com a droga foram devidas ao tratamento.

Escolhemos a dose de 400 mg/kg com base nos estudos de Miranda-Vilela et al., (2009; 2011) que utilizando essa dose de óleo de *C. brasiliense* em atletas, obteve resultados como: redução de injúrias no tecido e de danos no DNA, efeitos anti-inflamatório e redução de colesterol totais e LDL. Leite et al., (2009) também utilizando a mesma dose em camundongos Swiss, encontrou efeitos gastroprotetores para o óleo da polpa de *C. coriaceum*, espécie com proximidade genética ao *C. brasiliense*. Já a dose de 100 mg/kg foi escolhida para possibilitar a avaliação dose-resposta do tratamento. A sobrevivência de 100% dos animais mostrou que as respectivas doses utilizadas no tratamento com o óleo de pequi foram adequadas. Possivelmente as condições experimentais também adequadas, contribuíram para a ausência de óbitos. A dose de 400 mg/kg de óleo de pequi também não interferiu no

peso final e ganho de peso total do grupo OP400, quando comparado aos mesmos parâmetros do grupo Controle. Estes dados indicam que a dose de 400 mg/kg de óleo de Pequi não interfere no aspecto nutricional referente a manutenção e ganho de peso, portanto, pode ser usada com segurança em experimentos relacionados ao fígado que envolvem a administração oral, ou como aditivo alimentar.

Houve aumento no peso dos fígados (24%) e índice hepatossomático (IHS 20%) dos grupos (DEN, DEN+OP100 e DEN+OP400). Estes aumentos podem ser atribuídos à proliferação celular presentes nos fígados dos animais dos respectivos grupos. Sabe-se que a hepatotoxicidade pode provocar aumento ou redução no peso do órgão. O aumento pode ser afetado pela proliferação de hepatócitos levando a uma hiperplasia ou simplesmente o aumento de hepatócitos individuais (Haschek & Rousseaux, 1998). Portanto, relacionamos estes eventos aos efeitos (indiretos) do carcinógeno no fígado destes animais.

Nas análises da expressão de CK8/18 foi observada uma redução no número de perfis das áreas das lesões pré-neoplásicas CK8/18 – positivos no grupo DEN400. Em estudos realizados por Kakehashi et al. (2010) com camundongos com lesões hepáticas induzidas pela DEN, a elevação de CK8/18 nos focos basofílicos foi associada com a indução da proliferação celular, gerando o estresse nos hepatócitos resultando no acúmulo intracelular destas proteínas. Assim, a redução no número de FHA CK8/18 – positivos no grupo DEN+OP400, pode estar relacionada à atividade antiproliferativa das substâncias presentes no óleo de *C. brasiliense* discutido anteriormente, sugerindo que este mecanismo antiproliferativo do óleo de Pequi seja o responsável pela redução do volume total de lesões pré-neoplásicas observadas em nosso experimento. Contudo,

para verificar a hipótese deste mecanismo de ação, será necessário fazer o estudo do índice de proliferação celular nas lesões FHA CK8/18 – negativas.

Outra observação que também sugere o efeito protetor do óleo de Pequi contra injúrias no fígado foi a redução de hepatócitos positivos para CK8/18 na região centrolobular do grupo DEN+OP400. Nestas regiões os hepatócitos recebem sangue menos oxigenado e é também uma área de alta atividade enzimática responsável pela biotransformação de substâncias, portanto, os hepatócitos da região centrolobular são mais predispostos a danos causados por tóxicos e com recuperação mais lenta dessas regiões. Assim, provavelmente o óleo de pequi pode ter um papel protetor no processo inicial do desenvolvimento da lesão pelas propriedades antioxidantes de suas substâncias.

As citoqueratinas 8/18 foram positivas para FHA basófilos e adenomas de células basofílicas, reforçando o potencial dos FHA CK8/18 – positivos como biomarcadores em lesões pré-neoplásicas em fígado de camundongos demonstrado em estudos anteriores. Alguns FHA foram CK8/18 – negativos. A identificação destes focos CK8/18– negativos foram possíveis devido à comparação com as marcações pela coloração de HE da lâmina-espelho. Os FHA CK8/18 – negativos e CK8/18 - positivos não apresentaram diferenças histopatológicas aparentes, assim como no estudo realizado por Kushida et. al. (2011) que utilizando camundongos C57BL/6 induzidos pela DEN também observou FHA CK8/18 – negativos. Andersen et al. (2010) em estudo que investigou as diferenças moleculares de LPN CK19-positivas e negativas no fígado de ratos, encontrou que LPN CK19-negativas demonstraram um perfil gênico mais benigno, consistente com o parênquima hepático normal. Assim como CK8/18, CK19 também é um marcador prognóstico de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas no fígado. Portanto,

os FHA pré-neoplásicos CK8/18-negativos podem também envolver um potencial mecanismo para a regressão de lesões pré-neoplásicas no fígado de camundongos. No entanto, a caracterização dos FHA CK8/18 positivos e negativos e suas diferenças moleculares poderá elucidar estas questões.

Conclusão

7 Conclusão

O óleo de *C. brasiliense* possui atividade hepatoprotetora dose dependente no desenvolvimento de lesões hepáticas pré-neoplásicas em camundongos induzidos quimicamente com DEN. Suas propriedades quimiopreventivas possivelmente estão relacionadas à atividade antioxidante sinérgica das substâncias presentes no óleo e da capacidade deste na indução do processo de remodelação das lesões pré-neoplásicas, portanto, com potencial para uso na prevenção do câncer hepático.

8 Referências

Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research* 463: 111-172. 2000.

Almeida JrHL. Citoqueratinas. *An bras Dermatol*. 2004; 79(2):135-145.

Almeida SP. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico química e fonte potencial de nutrientes. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. *Cerrado: Ambiente e flora*. Planaltina: Embrapa-CAAC; 1998. Cap. 6, p. 247-285.

Almeida SP, Proença CEB, sano SM, Ribeiro JF. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. 3rd ed. Platina: Embrapa; 2000.

Almeida SP, Silva JA. Pequi e Buriti – Importância Alimentar para a População dos Cerrados. Planaltina: EMBRAPACAPAC; 1994. p 38.

Andersen, JB, Loi, R, Perra, A, Factor, V M, Ledda-Columbano, GM, Columbano, A, Thorgeirsson, SS. (2010). Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat. *Hepatology*. 2010. 51:1401–9.

Ambrogio F, Biganzoli E, Boracchi P. Multiple correspondence analysis in S-PLUS. *Comput Methods Programs Biomed*. 2005; 79: 161-167

Bannasch P. Preneoplastic lesions as end-points in carcinogenicity testing IHepatic preneoplasia. *Carcinogenesis*. 1986. v. 7, p. 689-95.

Bannasch P, Enzmann H, Klimek F, Webe RE, Zerban H. Significance of sequential cellular changes inside and outside foci altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Pathol*. 1989. v. 17, p. 617-29.

Bannasch P, Zerban H. Tumor of the liver. In: Turusov VS, Mohr U, eds. *Pathology of tumors in laboratory animals*. Lyon: IARC, 1990. 199–240.

Bannasch P, Nehrbass D, Kopp-Schneider A. Significance of hepatic preneoplasia for cancer chemoprevention. *IARC Sci Publ*. 2001;154:223-40

Barbisan LF, Scolastici C, Miyamoto M, Salvadori DMF, Ribeiro LR, Eira AF, Camargo JLV. Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Genetics and Molecular Research*. 2003. v. 2(3) p. 295-308.

Beltrão PCB, Texeira VR, Chammas R. Aspectos Moleculares da Transformação Celular: Conceitos e Implicações. In: Dan Linetzky Waitzberg. (Org.) Dieta, nutrição e câncer. 1a. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004, v. 1, p. 79-87.

Bertram JS. Dietary carotenoids, connexins and cancer: what is the connection? Biochem Soc Trans. 2004; 32: 985-9.

Bishr MO, Ku NO, Toivola DM. Keratins: Guardians of liver. Hepatology, 2002. p. 251-257.

Britton G. Structure and proprieties of carotenoids in relation to function. The FASEB journal. 1995. v.9.

Cardozo MT, Conti A, Ong TP, Scolatici C, Purgatto E, Horst MA, Bassali BK, Moreno FS. Chemopreventive effects of β -ionone and geraniol during rat Hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. Journal of Nutritional Biochemistry. 2011. 22: 130–135.

Chagas CE, Bassoli BK, de Souza CA, Deminice R, Júnior AA, Paiva SA, Dagli ML, Ong TP, Moreno FS. Folic acid supplementation during early hepatocarcinogenesis: Cellular and molecular effects. Int J Cancer. 2011

Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsia e perspectivas. Química Nova. 2007. v. 30 n. 2, p. 441-449.

Costa RMA, Menk CFM. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 2000. v.3, p.24-6.

Cupertino MC, Costa KL, Santos D, Novaes RD, Condessa SS, Neves AC., ... & Matta SL. Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. International journal of experimental pathology. 2013; 94(5), 343-351.

Damiani C. *Qualidade e perfil volátil de pequi (Caryocarbrasiliense Camb.) minimamente processado, armazenado sob diferentes temperaturas* [Dissertação]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2006.

Dragan YP, Rizui T, Xu Y-H. An initiation-promotion assay in rat live as a potencial complement to the 2-year carcinogenesis bioassay. Fund. Appl. Toxicol. 1991. v. 16, p. 525-47.

Da Silva, TC. *Efeitos da Pfaffia paniculata (ginseng brasileiro) sobre lesões pré-neoplásicas em camundongos submetidos a modelo de hepatocarcinogênese* [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.

Da Silva TC, Silva AP, Akisue G, Avanzo JL, Nagamine MK, Fukumasu H, Matsuzaki P, Raspantini PC, Haraguchi M, Górniak SL, Dagli ML. Inhibitory effects of Pfaffia paniculata (Brazilian ginseng) on preneoplastic and noplasic lesions in a mouse hepatocarcinogenesis model. Cancer Latters. 2005; 226: 107 – 113.

Da Silva TC, Cogliati B, Silva AP, Akisue G, Nagamine MK, Fukumasu H, Matsuzaki P, Haraguchi M, Górniak SL, Dagli ML. Pfaffia paniculata (Brazilian ginseng) roots

decrease proliferation and increase apoptosis but do not affect cell communication in murine Hepatocarcinogenesis. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2010; 62: 145–155.

Enes BN, Cardoso LM, Castro PM, Cesário CC, Sant'Ana HMP, Moreira AVB, Peluzio MCG. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): perfil de carotenóides, vitaminas e Atividade antioxidante. *Nutrire*. 2011; 36:17-17.

Engelbergs J, Thomale J, Rajewsky MF. Role of DNA repair in carcinogen-induced ras mutation. *Mutat. Res*. 2000. v. 450, p. 139-153.

Espíndola R.M., Mazzantini R.P, Ong TP, Conti AD, Heidor R, Moreno FS. Geranylgeraniol and β -ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF- κ B activation. *Carcinogenesis*. 2005; 26,1091–1099.

Facioli NL, Golçalves LAG. Modificação por via enzimática da composição triglicerídica do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). *Química nova*. 1998; 21(1).

Feo F, Pascale RM, Smile MM, Miglio MR, Muroi MR, Calvisi D. Genetic alterations in liver carcinogenesis: implications for new preventive and therapeutic strategies. *Oncogenesis*. 2000. 11(1): 19-62.

Ferreira RQ. *Desenvolvimento e aplicação de um novo ensaio para a determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de compostos modelo e de matrizes complexas* [Tese]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2009.

Fonseca MAV, Chagas CEA, Mazzantini RP, Heidor R, Ong TP, Moreno FS. All-trans and 9-cis retinoic acids, retinol and β -carotene chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve distinct actions on glutathione S-transferase positive preneoplastic lesions remodeling and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2005; 26 (11):1940–1946.

Fukumasu H, Da Silva TC, Avanzo JL, Lima CE, Mackowiak II, Atroch A, Spinosa HS, Moreno FS, Dagli ML. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse Hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*. 2006; 233: 158 – 164.

Gerster H. Intermediate cancer biomarkers and their use in β -carotene studies in humans. *Int J Vitam Nutr Res*. 1996. 66:3-18

Glauert HP, Calfee-Manson K, Stemm DN, Tharappel JC, Spear BT. Dietary antioxidants in the prevention of Hepatocarcinogenesis: A review. *Mol. Nutr. Food Res*. 2010; v. 54 p. 875 – 896.

Gloria NF, Soares N, Brand C, Oliveira FL, Borojevic Rodovan, Teodoro AJ. Lycopene and beta-carotene induce cell-cycle Arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines. *Anticancer Research*. 2014; 34: 1377-1386.

Gomes-Carneiro MR, Ribeiro-Pinto LF, Paumgartten FJR. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. *Cad. Saúde Públ.* 1997; 13(Supl. 1): 27-38.

Gradelet S, Le Bon AM, Bergès R, Suschetet M, Astorg P. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis*. 1998; 19: 403-411

Guerra RR. *Efeito do tratamento com fatores hepatotróficos em ratas (Wistar) induzidas experimentalmente à cirrose por Tioacetamida* [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.

Gundersen HJG, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology — reconsidered. *Journal of Microscopy*, 193: 199–211, 1999.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Haddad NF, Teodoro AJ, Oliveira FO, Soares N, Mattos RM, Hecht F, Dezone RS, Vairo L, Goldenberg RCS, Gomes CA, Carvalho DP, Gadelha MR, Nasciutti LE, Miranda-Alves L. Lycopene and Beta-Carotene Induce Growth Inhibition and Proapoptotic Effects on ACTH-Secreting Pituitary Adenoma Cells. *Plos One*. 2013; v. 8(5) e62773.

Haybaeck J, Stumptner C, Theringer A, Kolbe T, Magin TM, Hesse M, Fickert P, Tsybrovskyy O, Muller H, Trauner M, Zatloukal K, Denk H. Genetic background effects of keratin 8 and 18 in a DDC-induced hepatotoxicity an Mallory-Denk body formation mouse model. *Laboratory Investigation* .2012; 92, 857–867.

Harada T, Enomoto A, Boorman GA, Maronport RR. Liver and gallbladder. In: Maronport R. (Ed.). *Pathology of the mouse*. Vienna; Cache River Press, 1999. p. 119 – 183.

Haschek WM, Rousseaux CG. *Fundamentals of toxicologic pathology*. Califónia: Academic Press, 1998. p. 563.

Hasegawa R, Ito N. Liver medium-term bioassay in rats for screening of carcinogens and modifying factors in hepatocarcinogenesis. *Fd. Chem. Toxic.* 1992. v. 30, p. 979-92.

Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy*. Second Edition. 2010 (Reprint).

Hsiao PJ, Jao JC, Tsai JL, Chang WT, Jeng KS, Kuo KK. Inorganic arsenic trioxide induces gap junction loss in association with the downregulation of connexin43 and E-cadherin in rat hepatic “stem-like” cells. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2014; 30, 57 – 67.

Ito N, Tamano S, Shirai T. A medium-term rat liver bioassay for rapid *in vivo* detection of carcinogenic potential of chemical. *Cancer Sci*. 2003. v. 94, n. 1, p. 3–8.

- Kakehashi A, Kato A, Inoue M, Ishii N, Okazaki E, Wei M, Tachibana T, Wanibuchi H. Cytokeratin 8/18 as a new marker of mouse liver preneoplastic lesions. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010. 242: 47–55.
- Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Fay JR, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC. Mechanistic consideration in chemopreventive drug development. *J. Cell. Biochem. Suppl*. 1994. v. 20, p. 1 - 24.
- Kerr WE, Silva FR, Tchucarrame E. Pequi (*Caryocar brasiliense* camb.). Informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. *Rev. Bras. Frutic*. 2007. v. 29, n. 1, p. 169-171.
- Khoury J, Resck IS, Poças-Fonseca M, Souza TMM, Pereira LO, Oliveira ABB, Grisolia CK. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of the aqueous extract of pulp from “pequi” (*Caryocar brasiliense* Camb). *Gen Mol Biol*. 2007; 30:442-448.
- Kushida M, Kamendulis LM, Peat JT, Kauning JE. Dose-related induction of hepatic preneoplastic lesion by diethylnitrosamine in C57BL/6 mice. *Toxicologic Pathology*. 2011; 39: 776-786.
- Leenders MWH, Nijkamp MW, Rinkes IHM. Mouse models in liver cancer research: A review of current literature. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(45): 6915-6923.
- Leite Gd, Penha AS, da Silva GQ, Colares AV, Rodrigues FG, Costa JG, Cardoso AL, Campos AR. Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. *J Young Pharmacists*. 2009. 1:54-6.
- Lima A, Silva AMO, Trindade RA, Torres RP, Mancini-Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Rev. Bras. Frutic*. 2007. v. 29, n. 3, p. 695-698.
- Lima A, Mancini-Filho J. Compostos com atividade antioxidante no fruto Pequi (*Caryocar brasiliense*, L). *Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*. 2005. v. 30, p. 310.
- Lipsky MM, Hinton DE, Klaunig JE, Trump BF. Biology of hepatocellular neoplasia in the mouse. I. Histogenesis of safrole-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 1981. v. 67(2), p. 365-76.
- Marcos R, Monteiro RA, Rocha E. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. *Journal of anatomy*. 2012; 220(4), 303-317.
- Mainenti P, Rosa LEB. Carcinogênese química experimental em glândulas salivares – Revisão da literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2008. v. 54(2): 167-174.
- Mariano RGB, Couri S, Freitas SP. Enzymatic technology to improve oil extraction from *Caryocar brasiliense* Camb. (Pequi) pulp. *Rev. Bras. Frutic*. 2009. v. 31, n. 3, p. 637-643.
- Mariano-Da-Silva S, Brait JDA, Faria FP, Silva FP, Silva SM, Oliveira SL, Braga PF, Mariano-Da-Silva S. Chemical characteristics of pequi fruits (*Caryocar brasiliense*

Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás – Brazil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2009. v. 29(4): 771-777.

Mazzantini RP, Conti A, Moreno FS. Persistent and Remodeling Hepatic Preneoplastic Lesions Present Differences in Cell Proliferation and Apoptosis, as well as in p53, Bcl-2 and NF-kB Pathways. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2008. 103:538–546.

Miranda-Vilela AL, Pereira Luiz CS, Grisolia CK. Pequi fruit (Caryocar brasiliense Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners male and female runners. *Nutrition Research.* 2009. v. 29,p. 850-858.

Miranda-Vilela AL, Akimoto AK, Penha CZ, Pereira LCS, Klautau-Guimarães MN, Grisolia CK. Dietary carotenoid-rich oil supplementation improves exercise-induced anisocytosis in runners: influences of heptoglobin, MnSOD (Val9Ala), CAT (21/AT) and GPX1 (Pro 198Leu) gene polymorphisms in dilutional pseudoanemia (“sports anemia”). *Genetics and Molecular Biology.* 2010. v. 33(2) 359-367.

Miranda-Vilela AL, Zaidan-Alves PC, Akimoto AK ; Souza-Lordelo G, Nazaré Klautau-Guimarães MN, Grisolia CK. Under Increased Hydrogen Peroxide Conditions, the Antioxidant Effects of Pequi Oil (Caryocar brasiliense Camb.) to Decrease DNA Damage in Runners are Influenced by Sex, Age and Oxidative Stress-related Genetic Polymorphisms. *Free Radicals and Antioxidants.* 2011. v. 1, p. 27-39.

Michalopoulos, GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007. v. 213(2): 286–300.

Moreno FS, Wu TS, Naves MM, Silveira ER, OlorisSC, da Costa MA, Dagli ML, Ong TP. Inhibitory effects of β -carotene and vitamin A during the progression phase of hepatocarcinogenesis involve inhibition of cell proliferation but not alterations in DNA methylation. *Nutr. Cancer.* 2002; 44, 80–88.

Naves MM, Silveira ER, Dagli ML, Moreno FS. Effects of beta-carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat(1). *J Nutr Biochem.* 2001;12(12):685-92.

Na-On-Ku, Strnad P, Zhong BH, Tao GZ, Omary B. Keratins let liver: mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory – Denk. *Hepatology.* 2007. p. 1639 – 1649.

Novaes RD, Gonçalves RV, Marques DCS. et al. (2012) Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. *Toxicol. Pathol.* 40, 62–70.

Novo R, Azevedo PS, Minicucci FM, Zornoff LAM, Paiva SAR. Effect of beta-caroteno on oxidative stress and expression. Of cardiac connexin 43. *Arq Bras Cardiol.* 2013;101(3):233-239.

Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz L, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc.* 2007. p. 79.

Oliveira MNS, Gusmão E, Lopes PSN, Simões MOM, Ribeiro LM, Dias BAS. Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da

polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Rev. Bras. Frutic. 2006. v. 28, n. 3, p. 380-386.

Omary MB, Nam-On-Ku, Toivola DM. Keratins: Guardians of the liver. Hepatology. 2002. v. 34 (2), p. 251-257.

Park BS, Kwang-Geun L, TKyuki S, Sung-Eun L, Gary RT. Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003 v.51, n.1, p.295-300.

Peres WAF, Paula TP, Silva RARN, Coelho HSM. The role of vitamin A and carotenoids in the liver carcinogenesis. Revista Brasileira de Cancerologia. 2003. 49(2): 113-120.

Pitot HC, Dragan YP, Teegarden J, Hsia S, Campbell H. Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. Toxicologic Pathology. 1996. v. 24. n. 1. p. 119-128.

Radford R, Frain H, Ryan MP, Slattery C, McMorrow T. Mechanisms of chemical carcinogenesis in the kidneys. Int J Mol Sci. 2013. v 14(10), p. 19416–19433.

Ramos MIS, Umaki MCS, Hiane PI, Filho MMR. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitâmicos “A” da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) B.CEPPA. 2001. v. 19, n. 1, p. 2332.

Rodriguez-Amaya DB. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Arlington: OMNI Project. 1997. p 88.

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

Rizzi MB, Dagli ML, Jordão AA, Penteado MV, Moreno FS. beta-carotene inhibits persistent and stimulates remodeling gamma GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. Int J Vitam Nutr Res 1997; 67: 415-422.

Santos M, Monteiro RA, Rocha E. (2013). A stereological study of the volume-weighted volume and of the relative volume of the nucleus of normal and preneoplastic hepatocytes in a trout model of hepatocarcinogenesis. Experimental and Toxicologic Pathology, 65(5), 623-630.

Santos RA, Cabral TR, Antunes LMG, Andrade CP, Cardoso PCS, Bahia MO, Pessoa C, Nascimento JLM, Burbano RR, Takahashi CS. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated *invitro*. Biocell. 2008; 32(2): 195-200.

Schulte-Hermann R, Timermann-Trosier I, Barthel G, Bursch. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during Phenobarbital promotion. Cancer Research. 1990; v. 50: 5127-5135.

Scolastici C, Conti A, Cardozo MT, Ong TP, Purgatto E, Horst MA, Heidor M, Furtado KS, Bassoli BK, Moreno FS. β - Ionone Inhibits Persistent Preneoplastic Lesions During

the Early Promotion Phase of Rat Hepatocarcinogenesis: TGF- α , NF- κ B, and p53 as Cellular Targets, *Nutrition and Cancer*. 2014; 66:2, 234-241

Serpeloni JM, Vilegas W, Varanda EA, Cólus IM. Avaliação in vivo da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2008. v. 29, n. 1, p. 47-56.

Silva EA. *Avaliação morfológica e molecular pós-tratamento com os fatores hepatotróficos da cirrose hepática induzida em ratas pela Tioacetamida: análise a curto e longo prazo* [Dissertação]. Universidade de São Paulo; 2001.

Souza-Moreira TM, Salgado HRN, Pietro RCLR. O Brasil no contexto de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010. v. 20(3): 435 – 440.

Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Research*. 1976. v. 36, p. 2699–2702.

Steward WP, Brown K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *British Journal of Cancer*. 2013. v. 109, p. 1–7.

Stroescu C, Herlea V, Dragnea A, Popescu I. The diagnostic value of cytokeratins and carcinoembryonic antigen immunostaining in differentiating hepatocellular carcinomas from intrahepatic cholangiocarcinomas. *J Gastrointest Liver Dis*. 2006. 15, 9–14.

Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature reviews cancer*. 2003. v. 3 p. 768-780.

Tatematsu M, Nagamine Y, Farber E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer research*. 1983. v. 43.

Tharappel JC, Lehmler HJ, Srinivasan C, Robertson LW, Spear BT, Glauert HP. Effect of antioxidant phytochemicals on the hepatic tumor promoting activity of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77). *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 3467-3474

Trosko JE. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2003. v. 36, n. 1, 2. p. 43-48.

Toledo LP, Ong TP, Pinho AL, Jordão A, Vanucchi H, Moreno FS. Inhibitory effects of lutein and lycopene on placental glutathione S-transferase-positive preneoplastic lesions and DNA strand breakage induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis. *Nutr Cancer* 2003; 47: 62-69.

Ying TS, Sarma DSR, Farber E. The Sequential Analysis of Liver Cell Necrosis. *American Journal of Pathology*. 1980; v. 9: 1.

Yu Bb, Dong Sy, Yu Ml, Jiang Gj, Ji J, Tong Xh. Total flavonoids of *Litsea Coreana* enhance the cytotoxicity of oxaliplatin by increasing gap junction intercellular communication. *Biol. Pharm. Bull*. 2014; 37(8) 1315–1322.

Varanda EA. Atividade de plantas medicinais. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 2006. v. 27, n.1, p.1-7.

Vesselinovitch SD, Mihailovich N. Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. Cancer Research. 1983. v. 43, n. 9, p. 4253-4259.

Vesselinovitch SD, Koka M, Mihailovich N, Rao KV. Carcinogenicity of diethylnitrosamine in newborn, infant, and adult mice. J Cancer Res Clin Oncol. 1984. v. 108, p. 60–65.

Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids Up-regulate connexin 43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. Cancer Res. 1992. 52:5707-12.

Zhang P, Omaye ST. β -Carotene: interactions with α -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. Journal of Nutritional Biochemistry. 2001; 12:38-45.