Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciência Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Efeito quimiopreventivo da Beta-ionona na hepatocarcinogênese associada à fibrose hepática.

MAYARA LILIAN PAULINO MIRANDA

Tese para o obtenção do título de DOUTOR
Orientador Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2019

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciência Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Efeito quimiopreventivo da Beta-ionona na hepatocarcinogênese associada à fibrose hepática.

MAYARA LILIAN PAULINO MIRANDA

Versão Original

Tese para o obtenção do título de DOUTOR
Orientador Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Miranda, Mayara
M672e Efeito quimiopreventivo da Beta-ionona na hepatocarcinogênese associada à fibrose hepática / Mayara Miranda. - São Paulo, 2019.
98 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Moreno, Fernando

1. Ciências dos Alimentos. 2. Nutrição experimental . 3. Carcinogênese hepática. 4. Fibrose. I. T. II. Moreno, Fernando, orientador.

MAYARA LILIAN PAULINO MIRANDA

Efeito quimiopreventivo da Beta-ionona na hepatocarcinogênese associada à fibrose hepática.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título DOUTOR

Fernando Salvador Moreno
Prof. Dr. orientador/presidente

_____
1º. Examinador

_____
2º. Examinador

_____
3º. Examinador

_____
4º. Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família por toda compreensão e apoio durante mais esta jornada. À vocês meu amor incondicional.

"Quando as raízes são profundas, não há porque temer o vento"

Provérbio Chinês

Agradecimentos

À Deus, no qual encontro tranquilidade e fé para seguir.

Aos meus pais, Silvana e Mauro, meus maiores exemplos de determinação e garra, por serem meu porto seguro. Aos meus irmãos, Arthur e Marcel, obrigada por todo o apoio e compreensão. Ao meu querido avô José Paulino, meu maior incentivador, obrigada por sempre acreditar em mim.

Ao professor Fernando Salvador Moreno, meu orientador, por me receber e acolher em seu laboratório. Obrigada por me permitir trabalhar com uma referência em pesquisa, por compartilhar o seu conhecimento e por tudo que me ensinou como profissional e ser humano. Agradeço pelos desafios que só me fizeram ir mais longe e por todas as lições aprendidas durante essa jornada.

Ao professor Luís Fernando Barbisan, pelo qual tenho um profundo carinho e admiração, obrigada por todo auxílio com as análises histopatológicas. Agradeço pela parceria desde o mestrado e por tudo que me ensinou desde então.

Ao Guilherme Romualdo pelo auxílio com as marcações de CD68 e α-SMA.

Ao professor Eduardo Purgatto pela ajuda na análise de quantificação de β-ionona e por todo ensinamento durante a disciplina de Bromatologia.

Aos meus colegas e ao técnico do laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer, que direta ou indiretamente, me auxiliaram nessa jornada, obrigada pela troca de experiências e pelo riso sempre presente. Em especial à Ana Paula pelo auxílio nas análises de *western blot*.

Ás doutoras Kelly e Juliana, grandes profissionais com as quais eu tive o prazer de trabalhar, obrigada por mesmo de longe contribuírem tanto para a realização deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante o doutorado, especialmente a Amanda, Bianca, Bruna, Ernesto, Gabriela, Graziela, José Augusto, Lívia, Luciana, Marina, Matheus e Natália, a presença de vocês tornou essa experiência única. Obrigada pelas risadas, pelo

conhecimento compartilhado e por todo o apoio. Vocês com certeza foram essenciais nessa jornada.

Ao meu companheiro, Henrique Cardone obrigada por fazer dos meus sonhos os seus e por me incentivar a vencer todos os obstáculos.

Aos demais membros do Departamento de Ciências dos Alimentos pelo carinho e auxílio. Aos funcionários do biotério, pelos cuidados despendidos com os animais e pelo suporte que me foi dado nesta fase. À minha querida Lurdinha, por tentar manter a ordem no laboratório, por cuidar do departamento e pelos deliciosos cafés.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio na forma de bolsa de doutorado para o desenvolvimento deste projeto.

“Eu sou uma daquelas que acreditam que a ciência tem grande beleza”

Marie Curie

Resumo

MIRANDA, L. P. M. **Efeito quimiopreventivo da Beta-ionona na hepatocarcinogênese associada à fibrose hepática** 2019. 98f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O carcinoma hepatocelular (HCC) é a neoplasia primária mais frequente que acomete o fígado, a quarta principal causa de morte relacionada ao câncer e apresenta mau prognóstico. A fibrose hepática está presente em grande parte dos casos de HCC e é um dos principais fatores de risco para esta afecção. Segundo estudos prévios do grupo, a β-ionona (BI), presente em uvas e aromatizantes de vinho, apresenta potencial quimiopreventivo na hepatocarcinogênese principalmente por reduzir o número e tamanho de lesão pré neoplásica (LPN) e inibir a proliferação celular. No entanto, até o presente não foram identificados na literatura estudos que investigaram o efeito deste isoprenóide no processo fibrótico e na hepatocarcinogênese a ele associada. Desta forma, este estudo pretendeu investigar o potencial efeito quimiopreventivo da BI na hepatocarcinogênese associada à fibrose hepática. Para tanto, ratos machos *Wistar* foram tratados com óleo de milho (OM) [0,25 ml / 100 g de peso corporal (p.c.); Grupo de OM] ou BI (16mg / 100g p.c.; Grupo BI) durante 18 semanas. A partir da 2ª semana, todos os animais receberam uma dose intraperitoneal de dietilnitrosamina (DEN - 50 mg / Kg p.c.) uma vez por semana até a 16ª semana. Os animais foram eutanasiados em diferentes períodos do protocolo experimental: na 10ª semana (grupos OMP1 e BIP1), na 14ª semana (grupos OMP2 e BIP2) e na 18ª semana (grupos OMP3 e BIP3). O isoprenóide demonstrou, de maneira inédita na literatura, inibir o desenvolvimento da fibrose hepática em diferentes estágios da hepatocarcinogênese (pontos 1, 2 e 3) por reduzir ($p < 0,05$) a porcentagem de área marcada para picrosirius. Além disso, BI reduziu a porcentagem de área positiva para α- SMA ($p < 0,05$) e as concentrações de hidroxiprolina ($p < 0,05$) no ponto 2. Foi observada ação quimiopreventiva da BI nas fases iniciais da hepatocarcinogênese (pontos 1 e 2) mesmo em modelo associada a fibrose por reduzir ($p < 0,05$) o número e porcentagem de área do corte ocupada por LPN GSTP positivas. Este efeito não foi observado em fase mais avançada da hepatocarcinogênese (ponto 3). Corroborando este dado não foram observadas diferenças em relação ao número de tumores ($p \geq 0,05$) avaliados por imageamento e por análise histopatológica. No entanto, quando comparados ao seu controle (OMP3), os animais do grupo BIP3 apresentaram menor mortalidade e menor incidência ($p < 0,05$) de HCC high, considerado um tipo mais agressivo de HCC, sugerindo que este composto possa atuar na agressividade das células tumorais. O grupo BIP2 demonstrou ainda menor proliferação celular ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo OMP2. Assim foram avaliadas as vias de proliferação celular PI3K/AKT e MAPK/ERK, bem como as proteínas p21 e p53, relacionadas a progressão do ciclo celular. Não foram observadas($p \geq 0,05$) alterações nestas vias por parte do isoprenóide. O presente estudo demonstrou ação protetora da BI no desenvolvimento de fibrose, bem como na hepatocarcinogênese a ela associada. Contudo, são necessárias análises complementares para elucidar mecanismos pelos quais a BI atua na carcinigênese hepática associada à fibrose.

Palavras chave: Hepatocarcinogênese, fibrose, quimioprevenção, beta-ionona.

Abstract

MIRANDA, L. P. M. **Chemopreventive effect of Beta-ionone in hepatocarcinogenesis associated with hepatic fibrosis** 2019. 98f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the primary liver cancer, the fourth leading cause of death related to cancer and presents a poor prognosis. Hepatic fibrosis is present in most cases of HCC and represents one of the main risk factors for this condition. According to previous studies of the group, β-ionone (BI), present in grapes and wine flavorings, has a potential chemopreventive in hepatocarcinogenesis mainly by reducing the number and size of preneoplastic lesions (LPN) and inhibiting cell proliferation. However, to date, no studies have been identified in the literature that investigated the effect of this isoprenoid on the fibrotic process and in its association with hepatocarcinogenesis. Thus, this study aimed to investigate the potential chemopreventive effect of BI in hepatocarcinogenesis associated with hepatic fibrosis. Male Wistar rats were treated with corn oil (OM) [0.25 ml / 100 g body weight (b.w.); OM] or BI group (16mg / 100g b.w; BI group) for 18 weeks. From week 2, all animals received an intraperitoneal dose of diethylnitrosamine (DEN - 50 mg / kg b.w.) once in a week until week 16. The animals were euthanized at different periods of the experimental protocol: at week 10 (groups OMP1 and BIP1), at week 14 (groups OMP2 and BIP2) and week 18 (groups OMP3 and BIP3). The isoprenoid, for the first time in the literature, shown to inhibit the development of liver fibrosis at different stages of hepatocarcinogenesis (points 1, 2 and 3) by reducing ($p < 0.05$) the percentage of the area labeled for picrosirius. Also, BI reduced the percentage of α-SMA positive area ($p < 0.05$) and hydroxyproline concentrations ($p < 0.05$) at point 2. BI chemopreventive action was observed in the early stages of hepatocarcinogenesis (point 1 and 2) even in a model associated with fibrosis for reducing ($p < 0.05$) the number and percentage of the liver section area occupied by GSTP positive LPN. This effect was not observed at a later stage of hepatocarcinogenesis (point 3). Corroborating this data, no differences were observed regarding the number of tumors ($p \geq 0.05$) evaluated by imaging and histopathological analysis. However, when compared to its control (OMP3), animals from the BIP3 group had lower mortality and lower incidence ($p < 0.05$) of HCC high, considered a more aggressive type of HCC, suggesting that this compound may act in aggressiveness of tumor cells. The BIP2 group also showed lower cell proliferation ($p < 0.05$) when compared to the OMP2 group. Thus, PI3K / AKT and MAPK / ERK cell proliferation pathways were evaluated, as well as p21 and p53 proteins, related to cell cycle progression. No changes were observed in these pathways by the isoprenoid ($p \geq 0.05$). The present study demonstrated the protective action of BI in the development of fibrosis, as well as its association with hepatocarcinogenesis. However, further analysis is needed to elucidate mechanisms by which BI acts on fibrosis-associated liver carcinogenesis.

Keywords: Hepatocarcinogenesis, fibrosis, chemoprevention, beta-ionone.

Lista de Abreviaturas

ADH	Adenoma hepatocelular
AKT	*Protein kinase B*
BI	β –ionona
BIP1	β –ionona ponto 1
BIP2	β –ionona ponto 1
BIP3	β –ionona ponto 3
CBAs	Compostos bioativos presentes nos alimentos
CCA	Colangeocarcinoma
CDKs	Ciclinas dependentes de quinase
CHE	Células hepáticas estreladas
CSC	*Cancer stem Cells*
CT	Tomografia computadorizada
DEN	Dietilnitrosamina
DHGNA	Doença hepática gordurosa não-alcoólica
EGF	*Epidermal growth factor*
ERK	*Extracellular signal regulated kinases*
FBP	*Filtered Back Projection*
GST-P	Glutationa S-transferase forma placentária
GTP	G*uanosine Triphosphate*
H&E	Hematoxilina e Eosina
HBV	Vírus das hepatites B
HCC	Carcinoma Hepatocelular
HCV	Vírus das hepatites C
IRS	Insulin receptor substrate 1
LDGC	Lesão displásica de grande células alteradas
LDPC	Lesão displásica de pequenas células alteradas
LPN	Lesão pré-neoplásica
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MDM2	*Murine doble minute 2*
MEC	Matrix extracelular
MEK	*MAP-ERK kinase*

MMPs	Metaloproteinases de matrix
mTOR	*Mammalian target of rapamycin*
NDAG	Nódulos diplásicos de alto grau
NDBG	Nódulos displásicos de baixo grau
NF-κB	T*ranscription factor nuclear factor-κB*
NK	*Natural killers*
NT	Não tratado
OM	Óleo de milho
OMP1	Óleo de milho ponto 1
OMP2	Óleo de milho ponto 2
OMP3	Óleo de milho ponto 3
OSEM	*Ordered Subsets Expectation Maximization*
PDGF-β	*Platelet-derived growth factor-β*
PET	*Positron-emission tomography*
PI	Padrão interno
PI3K	*Phosphoinositide 3-kinase*
pLPN	Lesão pré-neoplásica persistente
PTEN	*Phosphatase and tensin homolog*
RAF	*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*
RAS	*Rat Sarcoma Viral*
RH	Hepatócito resistente
rLPN	Lesão pré-neoplásica em remodelação
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SUV	*Standardized Uptake Value*
TGF-α	Transforming growth factor-α
TIMPs	Inibidores teciduais de MMPs
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VOIs	*Volume of interest*
α- SMA	α-actina do músculo liso
18F-FDG	*[18F]-fluoro-2-desoxi-Dglucose*

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema Representativo de processo fibrótico. 21

Figura 2: Delineamento experimental 36

Figura 3: Evolução do peso corpóreo dos animais dos grupos: não tratado (NT), submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI)..... 45

Figura 4: Evolução do consumo médio de ração dos animais dos grupos: não tratado (NT), submetimetos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) 46

Figura 5: Concentração hepática de β-ionona dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1), 14ª (P2) e 18ª semana (P3). 49

Figura 6: Grau de fibrose hepática dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1), 14ª (P2) e 18ª semana (P3). 50

Figura 7: Quantificação do índice de proliferação celular marcadas com PCNA do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana.. 53

Figura 8: Quantificação do índice apoptótico do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. 54

Figura 9: Quantificação do número de células CD68+/mm² do fígado dos animais submetidos à modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana..... 55

Figura 10: Quantificação da área marcada por picrosirius do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1), 14ª (P2) semana e 18ª semana (P3) 56

Figura 11: Quantificação da porcentagem de área positiva para α – Sma do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. 57

Figura 12: Densitometria da atividade proteolítica das MMP-2 (Pro e ativa) e MMP-9 (Pro e ativa) do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. 58

Figura 13: Concentração hepática de hidroxiprolina no fígados dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 14ª (P2) semana.. 59

Figura 14: Imagem representativa de *western blot* e densitometria de p21 e β-actina do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana.. 60

Figura 15: Imagens representativas de *western blot* e densitometria de p53 e β-actina do fígado dos animais submetidos à modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana.. 61

Figura 16: Imagens representativas de *western blot* e densitometria de NFκB e β-actina do fígado dos animais submetidos à modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. 62

Figura 17: Imagens representativas de *western blot* e densitometria de ERK, pERK, da razão pERK/ERK e β-actina do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana.. 63

Figura 18: Imagens representativas de *western blot* e densitometria de PTEN, pPTEN, da razão pPTEN/PTEN e β-actina do fígados dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) nas 10ª (P1) e 14ª (P2) semanas.. 64

Figura 19: Imagens representativas de *western blot* e densitometria de AKT, pAKT, da razão pAKT/AKT e β-actina do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana.. 65

Lista de tabelas

Tabela 1: Grupos de MMPs e principais substratos de ativação. 22

Tabela 2: Pesos corpóreos iniciais e finais e hepáticos absoluto e relativo dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3). 47

Tabela 3: Incidência, número médio e número total de nódulos macroscópicos dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3). 48

Tabela 4: Incidência de neoplasias observadas no fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3). 51

Tabela 5: Análise morfométrica para marcação com GST-P, demonstrando número de LPN por cm^2, tamanho médio das LPNs (mm^2) e porcentagem de área hepática ocupada pelas mesmas no fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3). 52

Sumário

1. Introdução 19
2. Revisão da literatura 20
2.1 Fibrose e Cirrose hepática 20
2.2. Carcinogênese 23
2.2 Hepatocarcinogênese 24
2.2.1 Lesões pré-neoplásicas (LPN) 25
2.2.2 Lesões e Nódulos Displásicos 25
2.2.3 Adenoma Hepatocelular (ADH) 26
2.2.4 Colangiocarcinoma (CCA) 27
2.2.5 Carcinoma Hepatocelular (HCC) 27
2.4.3 Vias moleculares 28
2.4.2 Hepatocarcinogênese experimental 30
3. Nutrientes e compostos bioativos e carcinogênese hepática 31
3.1 Quimioprevenção 31
3.2 β – ionona 32
3. Objetivos 33
3.1 Objetivo Geral 33
3.2 Objetivo Específico 33
4. Material e Métodos 34
4.1 Animais 34
4.2 Protocolo experimental 34
4.3 Eutanásia dos animais e coleta das amostras 36
4.4 Exame Macroscópico dos Fígados 37
4.5 Imageamento das neoplasias dos animais eutanasiados na 18ª semana (P3) 37
4.6 Quantificação de βI no fígado 38
4.7 Análise histopatológica 38
4.7.1 Grau de fibrose por H&E dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3) 38
4.7.2 Identificação e avaliação de tipos de neoplasias dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3) 39
4.7.3 Avaliação da apoptose no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2) 39

4.8 Marcação da coloração de picrossírius no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3) 39

4.9 Imunoistoquímica 40

4.9.1 Imunoistoquímica para GST-P, PCNA, α-SMA e CD38 no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2) 40

4.10 Processamento de zimografias para MMP-2 e MMP-9 dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2) 41

4.11 Western blotting na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)..... 42

4.12 Avaliação das concentrações hepáticas de hidroxiprolina dos animais eutanasiados na 14ª semana (P2) 43

4.13 Análise estatística 44

5. Resultados..... 45

5.1 Evolução de peso corporal..... 45

5.2 Consumo de ração 46

5.3 Pesos iniciais, finais, hepáticos absoluto e relativo dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3) 47

5.4. Macroscopia 48

5.5 Quantificação hepática de BI dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3) 49

5.6. Grau de fibrose dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3) 49

5.7. Avaliação das neoplasias..... 50

5.7.1 Imageamento das neoplasias observadas nos animais eutanasiados na 18ª semana (P3) 50

5.7.2.Classificação das neoplasias observadas nos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3) 51

5.8 Análise de LPNs GST-P positivas dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3)..... 51

5.9 Avaliação da proliferação celular no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2) 53

5.10 Avaliação da apoptose no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2) 54

5.11 Análise de macrófagos no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2) 55

5.12 Análise de picrosirius no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2) 56

5.13 Análise de α – SMA no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2) 57

5.14 Zimografia do fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2) 57

5.15 Concentrações hepáticas de hidroxiprolina dos animais eutanasiados na 14ª semana (P2) 59

5. 16 *Westen blot* do fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2) 60

5.16.1 Quantificação da proteína p21 60

5.16.2 Quantificação da proteína p53 61

5.16.3 Quantificação da NFκB (p65) 62

5.16.4 Quantificação de ERK (Total e fosoforilada) 63

5.16.5 Quantificação de PTEN (Total e fosoforilada) 64

5.16.6 Quantificação de AKT (Total e fosoforilada) 65

6. Discussão 66

8.Referências 71

Anexo 1 –Comitê de Ética 84

Anexo 2 – Imagens representativas do fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3) e de neoplasias identificadas por 18F-FDG .. 85

Anexo 3 – Imagens representativas do grau de fibrose 86

Anexo 4 – Imagens representativas de ADH, CCA e HCC (*low* e *high*) 87

Anexo 5 – Imagens representativas de GST-P, Apoptose, PCNA, Picrosirius, CD68+ e α-SMA. 88

Anexo 6 – Imagens representativas de gel de zimografia. 89

Anexo 7 - Ficha do Aluno 90

Anexo 8 - Currículo Lattes 92

1. Introdução

O câncer é grande problema de saúde pública no mundo. Para o ano de 2030 a incidência esperada é de mais de 20 milhões de novos casos (Bray *et al.*, 2018). No Brasil, para o biênio 2018-2019 estimou-se a ocorrência de cerca de 600 mil casos de câncer (Inca, 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incidência de câncer aumentou para, aproximadamente, 18,1 milhões de novos casos e foram registradas 9,6 milhões mortes relacionadas à doença. As neoplasias com maior mortalidade correspondem ao câncer de pulmão, colorretal, estomago e fígado (Bray *et al.*, 2018).

O carcinoma hepatocelular (HCC) é a neoplasia primária mais frequente no fígado (Affo *et al.*, 2017). O HCC apresenta mau prognóstico e sobrevida média de apenas 6 meses após o diagnóstico (Blonski *et al.*, 2010). Além disso, as terapias disponíveis para o mesmo, como a ressecção ou o transplante hepático, injeção percutânea de etanol e a ablação por radiofrequência perdem sua efetividade com o agravamento da doença (Raza e Sood, 2014). Diversos fatores de risco predispõe ao desenvolvimento do HCC, o mais comum é a presença de cirrose e fibrose que se apresentam em cerca de 80% dos casos de HCC (Baglieri *et al.*, 2019).

Considerando-se o progressivo aumento no número de casos de HCC no mundo e o mau prognóstico desta doença, o estudo do HCC tem por finalidade entender os mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares desta doença o que auxilia na detecção e no desenvolvimento de estratégias de tratamento e prevenção (De Minicis *et al.*, 2013).

2. Revisão da literatura

2.1 Fibrose e Cirrose hepática

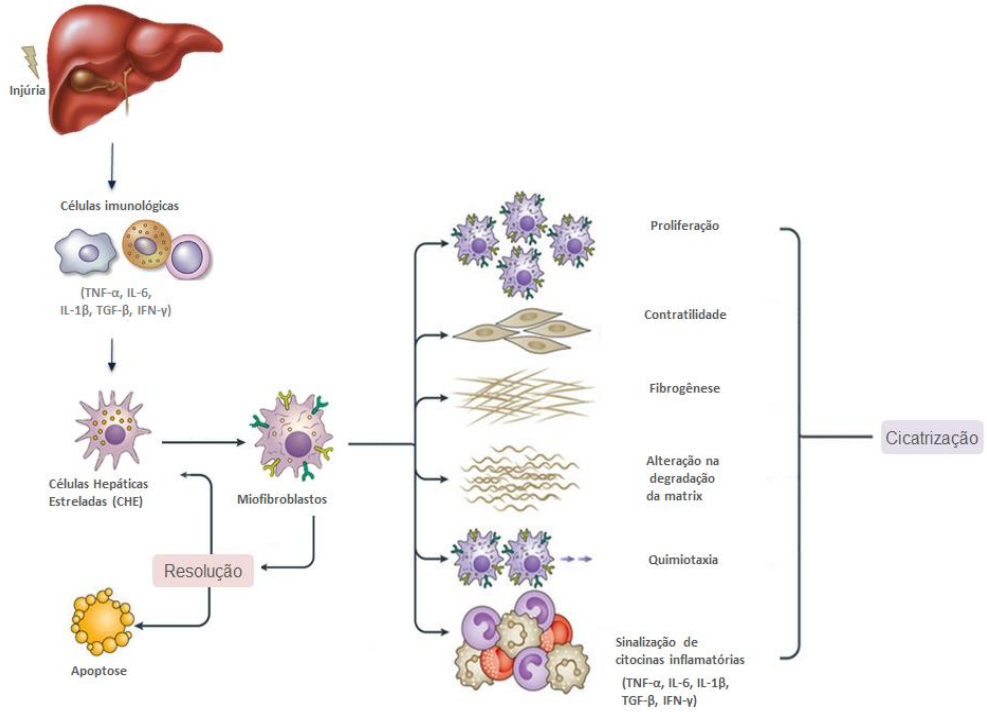
Os hepatócitos, as principais células que compõe o parênquima hepático (Zhou *et al.*, 2016), estão sujeitos a diversos agentes que levam toxicidade hepática (O'rourke *et al.*, 2018). O dano gerado por esses agentes pode desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), apoptose, dano no DNA, inflamação, proliferação celular compensatória e fibrose hepática (Wynn e Ramalingam, 2012; Baglieri *et al.*, 2019). A fibrose, portanto, é reconhecida como a resposta hepática de cicatrização a um dano agudo (O'rourke *et al.*, 2018).

O microambiente inflamatório leva à ativação de um grupo celular conhecido como células hepáticas estreladas (CHE), que se localizam no espaço de Disse entre os hepatócitos e as células endoteliais e são caracterizadas por armazenar vitamina A em gotículas lipídicas (Traber *et al.*, 2013; Pellicoro *et al.*, 2014). Após sua ativação as CHE se transdiferenciam em miofibroblastos, perdem as gotículas de lipídios e os retinóides e aumentam a secreção de proteínas de matriz extracelular (MEC) (Tsuchida e Friedman, 2017) **(Figura 1)**. A ativação das CHE ainda pode ser desencadeada por diferentes tipos celulares como hepatócitos, macrófagos, células biliares epiteliais, células progenitoras, células hepáticas sinusoidais, *natural killers* (NK), linfócitos B e T e plaquetas por meio da secreção de hormônios, citocinas inflamatórias, ROS e outras moléculas de sinalização (Tsuchida e Friedman, 2017; Roderfeld, 2018).

Os miofibroblastos são células importantes no processo de fibrogênese, pois possuem pronunciada capacidade de proliferação e contratilidade. Além disso, quando ativos contribuem para o processo de fibrogênese por meio da deposição de componentes de MEC como a proteína α-actina do músculo liso (α-SMA) e colágeno I e III (Pellicoro *et al.*, 2014; Higashi *et al.*, 2017) (**Figura 1**). No fígado normal majoritariamente a MEC é constituída de colágenos tipo IV e VI. Entretanto, no processo de fibrose hepática há um aumento do acúmulo de colágenos fibrilares dos tipos I e III além de uma deposição de glicoproteínas não colágenas como fibronectina, laminina, hialuronano, elastina e proteoglicanos (Baglieri *et al.*, 2019).

Os miofibroblastos são ainda responsáveis pela secreção e metabolismo de fatores de crescimento responsáveis por sustentar tanto o processo fibrótico como também a

resposta inflamatória crônica (Tsuchida e Friedman, 2017). O excesso de colágeno está associado à perda de microvilosidades nos hepatócitos e à perda de fenestras endoteliais nos capilares sinusóides (capilarização) (Campana e Iredale, 2017).



Adaptado de Tsuchida e Friedman, 2017.

Figura 1: Esquema Representativo de processo fibrótico.

A degradação da matriz, por sua vez é determinada pelo balanço entre metaloproteases de matriz (MMPs) e inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). As MMPs constituem uma família de endopeptidases dependentes de zinco e cálcio capazes de degradar grande parte dos componentes da MEC (Duarte *et al.*, 2015; Campana e Iredale, 2017). As MMPs são produzidas em uma forma inativa (zimogênio) (Itoh, 2015). A ativação das MMPs envolve a proteólise do pro-domínio, responsável por proteger o mecanismo catalítico, resultando na liberação da MMP ativa. Para que a ativação ocorra é necessário ainda que cada MMPs receba a ligação de substratos específicos (Gaffney *et al.*, 2015) **(Tabela 1)**.

Tabela 1: Grupos de MMPs e principais substratos de ativação.

Grupo	MMPs	Principais substratos
Colagenases	MMP-1 MMP-8 MMP-13	Colágenos tipo I, II e III,
Estromelisinas	MMP-3 MMP-10 MMP-11	Colágenos tipo III, IV, V, laminina, elastina, fibronectina e gelatina
Gelatinas	MMP-2 MMP-9	Gelatina, colágeno tipo IV V e VII
Matrilisinas	MMP-7 MMP26	Laminina, elastina, fibronectina e gelatina
Metaloproteinases de membrana (MT-MMP)	MMP-14 MMP15 MMP16 MMP17 MMP24 MMP25	Gelatina, colágeno tipo I, II, III, proMMP-2, proMMP-13, fibronectina, galectina, laminina, fibrina/fibrinogênio, betaglicano, progranulina

Adaptado de (Tsukada *et al.*, 2006; Itoh, 2015)

A regulação hepática das MMPs pode ocorrer por mecanismo epigenéticos como microRNA, modificações transcricionais e pós-traducionais, além de fatores que podem influenciar na secreção, ativação, especificidade do substrato e na degradação e depuração das MMPs (Roderfeld, 2018). A atividade das MMPs é ainda dependente da ação de reguladores específicos os TIMPs (Campana e Iredale, 2017). Os TIMPs interagem com os sítios ativos das MMPs bloqueando sua capacidade proteolítica e assim, inibindo a degradação da MEC (Tsukada *et al.*, 2006). O desequilíbrio da relação de MMP - TIMP têm sido associado à fibrose, invasão do tumor e angiogênese (Duarte *et al.*, 2015).

A fibrose é, portanto, um complexo processo de cicatrização que comprende uma ampla gama de proteínas, e pode se apresentar em diferentes graus desde fibrose leve até sua forma mais grave a cirrose (Xu *et al.*, 2012). Na cirrose ocorrem importantes alterações estruturais e funcionais que resultam no desenvolvimento de hipertensão portal reconhecida como a principal complicação da cirrose hepática, que pode dar origem a outras complicações clinicamente relevantes como a ascite, sangramento por varizes, encefalopatia hepática e insuficiência renal (Böttcher e Pinzani, 2017). Além disso, a inflamação e a fibrogênese predispõem o fígado à displasia e posteriormente à

transformação maligna tendo, portanto, o microambiente inflamatório um papel proeminente no início da evolução do câncer hepático (Waller *et al.*, 2015).

2.2. Carcinogênese

O processo de transformação maligna requer cerca de metade a 2/3 da vida das diferentes espécies, ou compreende cerca de 20 a 40 anos no caso de neoplasias sólidas em humanos (Farber, 1990; Loeb *et al.*, 2003). A carcinogênese, é o processo pelo a neoplasia se desenvolve. Este processo envolve múltiplas etapas, destacando-se didaticamente três principais: a iniciação, a promoção e a progressão, que se distiguem quanto à morfologia e a alterações as moleculares (Pitot, 2001).

A primeira etapa da carcinogênese, é reconhecida como a fase de iniciação e envolve modificações genéticas irreversíveis e permanentes na célula afetada (Hanahan e Weinberg, 2000; Pitot, 2001). O dano celular é então fixado pela replicação do DNA, e, quando seguido de divisão celular, é convertido em alterações herdáveis, reconhecidas como mutações (Bertram, 2000). A etapa subsequente, é conhecida como promoção, caracterizada pela expansão clonal das células iniciadas na presença contínua de um agente promotor, originando as lesões pré-neoplásicas (LPN) (Luch, 2005). A etapa de promoção é uma fase reversível que apresenta grande período de latência, e portanto, é alvo da ação de agentes quimiopreventivos. Na etapa subsequente conhecida como progressão, as células pré-malignas transformam-se em malignas, com descontrole da divisão celular, instabilidade genética, aneuploidias, amplificações e deleções gênicas. Além disso, é irreversível (Pitot, 2001; 2007).

Modificações genéticas irreversíveis, como o dano no DNA, podem ser causadas por agentes químicos, físicos e biológicos como produtos químicos genotóxicos, radiação ionizante e ultravioleta e infecções virais como vírus da hepatite B e hepatite C. Estes agentes podem induzir, por exemplo, quebra de fita simples ou dupla fita, despareamento de bases e ligações cruzadas do DNA (Liu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). Além de modificações genéticas, alterações epigenéticas também estão envolvidas no processo de carcinogênese em todos os estágios. Estas consistem em modificações estruturais em regiões genômicas que alteram a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA. Os principais tipos inter-relacionados de herança epigenética são a metilação do DNA, modificações nas histonas e a regulação da expressão gênica por microRNAs (Feinberg e Tycko, 2004).

Essas alterações, genéticas e epigenéticas, conferem à célula neoplásica potencial heterogêneo que pode se referir tanto a presença de subpopulações celulares com genótipos e fenótipos distintos entre os tumores e suas metástases (intertumoral) quanto entre tumores do mesmo subtipo histopatológico (intratumoral) (Fisher *et al.*, 2013). Já foram propostos na literatura modelos para explicar o potencial heterogêneo das células tumorais como os modelos estocástico e o hierárquico (Odoux *et al.*, 2008).

No modelo hierárquico as neoplasias têm sua origem a partir de um grupo de células conhecidas como "*cancer stem cells*" (CSC) ou células tronco neoplásicas (Nguyen *et al.*, 2012) . A célula tronco é uma célula indiferenciada capaz de renovar-se e também de gerar células diferenciadas. Células-tronco totipotentes são encontradas no embrião, enquanto que em estágios mais avançados do desenvolvimento, no feto e no adulto, as células-tronco são multipotentes. Aquelas mais próximas da diferenciação final, residentes no tecido, são chamadas células progenitoras (Mishra *et al.*, 2009; Roskams *et al.*, 2010).

Na presença de estímulos proliferativos crônicos, como uma hepatectomia parcial, por exemplo, um compartimento de células tronco/progenitoras que dá origem às células ovais é ativado. Estas células podem se diferenciar em hepatócitos ou células epiteliais dos ductos biliares (colangiócitos) bem como dar origem à neoplasia hepática (Roskams, 2008; Mishra *et al.*, 2009; Oishi e Wang, 2011), uma vez que esse estado proliferativo crônico poderia favorecer a transformação destas células imaturas, que interrompem o processo de diferenciação em curso e se tornariam potencialmente neoplásicas (Marquardt e Thorgeirsson, 2010; Govaere e Roskams, 2015).

Por sua vez, no modelo estocástico assume-se que células neoplásicas adquirem conjuntos de mutações somáticas e desenvolvem a capacidade metastática (Odoux *et al.*, 2008).Experimentalmente, este modelo produz células com menor capacidade proliferativa e mimetiza uma hierarquia na qual a presença de CSCs é rara (Nguyen *et al.*, 2012).

2.2 Hepatocarcinogênese

A hepatocarcinogênese é um processo complexo iniciado a partir de um microambiente hepático alterado, tipicamente relacionado à doença hepática crônica caracterizada por inflamação e fibrose. Essa alteração no microambiente é

responsável por alterar vias de sinalização celular distintas e acumular alterações genéticas em hepatócitos normais (Mazzanti *et al.*, 2016). Aproximadamente 90% das neoplasias que acometem o fígado são HCCs, porém o câncer hepático também pode se manifestar na forma de colangiocarcinoma (CCA), a segunda neoplasia primária mais comum, ou ainda como adenoma hepatocelular (ADH) (Affo *et al.*, 2017).

2.2.1 Lesões pré-neoplásicas (LPN)

Na carcinogênese hepática é possível observar o aparecimento de uma série de lesões morfologicamente distintas denominadas como LPN (Libbrecht *et al.*, 2005). Em fases iniciais da hepatocarcinogênese é possível observar que cerca de 95-98% das LPN regridem e não evoluem para neoplasias, sofrendo "remodelação" (LPN em remodelação - rLPN), um processo complexo que envolve mudanças no suprimento sanguíneo e em características bioquímicas, bem como da estrutura e arquitetura celulares, fazendo com que o fígado retorne ao aspecto "normal" anterior. As LPNs restantes (2-5%) seguem a persistência (LPN persistentes – pLPN), adquirem a capacidade de crescimento autônomo e progridem para adenomas e HCC (Higashi *et al.*, 2004; Feo *et al.*, 2008).

As LPNs podem ser identificadas pela expressão de proteínas específicas, como glutationa S-transferase na forma placentária (GST-P) (Zhang *et al.*, 2014). A GST-P é uma das enzimas de desintoxicação que compõe a família da glutationa S-transferase (Suzuki *et al.*, 2004). Maiores concentrações dessa enzima já foram observadas em diversos tumores sólidos como ovário, mama, pâncreas, cólon e fígado (Zhang *et al.*, 2014). Na hepatocarcinogênese química a GST-P é considerada um importante marcador de LPNs (Suzuki *et al.*, 2004).

2.2.2 Lesões e Nódulos Displásicos

No processo de hepatocarcinogênese é possível observar o aparecimento de lesões displásicas microscópicas (que podem ser compostas de pequenas ou grande células alteradas) e nódulos displásicos macroscópicos (de alto ou baixo grau) (Roncalli *et al.*, 2010). A displasia compreende uma contínua transformação maligna

na qual se observa alterações na proliferação e diferenciação celular (Park e Roncalli, 2006). A lesão displásica de grande células alteradas (LDGC) é caracterizada por hepatócitos com aumento volume celular e nuclear, pleomorfismo nuclear e multinucleação, nucléolos proeminentes e relação nucleocitoplasmática (N: C) preservada (Park e Roncalli, 2006). Já as lesões displásicas de pequenas células alteradas (LDPC), por sua vez, são compostas por hepatócitos que apresentam diminuição do volume celular, pleomorfismo nuclear mínimo, aumento da relação N: C e aumento da densidade nuclear. Além disso, quando comparadas às LDGC apresentam maior acúmulo de danos no DNA e, portanto, representariam uma lesão mais avançada (Chan e Burt, 2011).

Os nódulos displásicos de baixo grau (NDBG) são lesões com reduzido potencial de malignidade. São caracterizadas pela arquitetura hepática preservada e pela citologia atípica ocasional. Os nódulos diplásicos de alto grau (NDAG), estão mais relacionados ao desenvolvimento de neoplasias, apresentam citologia atípica proeminente, além de alterações importantes na arquitetura normal do fígado (Roncalli *et al.*, 2007).

2.2.3 Adenoma Hepatocelular (ADH)

O ADH é uma neoplasia incomum, sólida e benigna que acomete o fígado (Thomeer *et al.*, 2016). As lesões são encontradas incidentalmente em pacientes submetidos a tecnologias de imagem, como à ultrassonografia ou ressonância magnética, por causa de sintomas não relacionados ou inespecíficos (Vijay *et al.*, 2015). A maior prevalência é descrita em mulheres que fazem uso de contraceptivos orais, entretanto, outros fatores de risco também são descritos como uso de esteróides anabolizantes, obesidade e síndrome metabólica (Margolskee *et al.*, 2016).

O ADH geralmente é uma neoplasia bem delineada e, ocasionalmente, ligada ao parênquima composto de placas de hepatócitos separados por sinusóides (Agrawal *et al.*, 2015). A maioria dos ADHs não apresenta arquitetura nodular, cicatriz central ou reação ductular proeminente, mas essas características podem ocorrer em subtipos inflamatórios de ADHs (Shafizadeh e Kakar, 2011).

O ADH pode variar em tamanho de 1 a 30 cm e regredir sem intervenção cirúrgica (Vijay *et al.*, 2015). Embora no fígado possa se apresentar como uma única

lesão, podem ocorrer casos de múltiplos adenomas configurando um quadro de adenomatose (presença de mais de 10 lesões) (Margolskee *et al.*, 2016). Nos ADH com o gene β-catenina mutado há um maior risco de transformação maligna, e nesses casos, o ADH pode ser considerado uma lesão precursora de HCC (Schlageter *et al.*, 2014).

2.2.4 Colangiocarcinoma (CCA)

Além de ser a segunda neoplasia maligna primária que mais acomete o fígado, o CCA é a neoplasia mais frequente do trato biliar (Blechacz, 2017). O CCA é um grupo heterogêneo de tumores que podem surgir dos canais de Hering para o ducto biliar principal (Kirstein e Vogel, 2016) e pode ser classificado como intra-hepático, ou extra-hepático (distal ou perihiliar) com base na sua localização anatômica (Esnaola *et al.*, 2016).

O CCA intra-hepático, surge de pequenos ductos no fígado e pode atingir um tamanho grande antes da doença se tornar sintomática. Em contrapartida, os CCAs ductais surgem de grandes ductos até a segunda ordem de ramificação e os pacientes apresentam obstrução do trato biliar (Patel, 2011). Os CCA classicamente são adenocarcinomas constituídos por túbulos, acinos, ou trabéculas, geralmente incorporados em estroma desmoplásico (Esposito e Schirmacher, 2008).

Alguns dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do CCA incluem colangite esclerosante primária, doença de Caroli, cisto biliares, hepatolitíase, cirrose, parasitas hepatobiliares (*Opisthorchis viverrini* e *Clonorchis sinensis*) e infecções pelos vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV) (Blechacz, 2017). Os CCAs geralmente são detectados e diagnosticados clinicamente em estágio avançado e a maioria tem um mau prognóstico mesmo após à ressecção cirúrgica (Nakanuma e Kakuda, 2015).

2.2.5 Carcinoma Hepatocelular (HCC)

O HCC é uma neoplasia extremamente heterogênea (Mazzanti *et al.*, 2016), cuja transformação maligna pode originar-se de vários tipos de células, incluindo hepatócitos maduros e células progenitoras (Llovet *et al.*, 2016). A frequência do HCC pode variar em virtude de diversos fatores de risco, como infecções pelos vírus das

hepatites B (HBV) e C (HCV), ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas, consumo crônico de bebidas alcoólicas, uso de tabaco, hemocromatose, radiação, exposição a substâncias químicas e doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) (Kulik e El-Serag, 2019).

O diagnóstico do HCC é frequentemente observado em pacientes em estágios avançados / sintomáticos, sendo que as opções terapêuticas são limitadas (Hernandez-Gea *et al.*, 2013). Na detecção do HCC podem ser utilizados marcadores sorológicos, assim como tecnologias de imagemento, como ultra-sonografia abdominal e ressonância magnética; entretanto estes métodos têm fatores limitantes como sensibilidade reduzida e alto custo (Chen e Lee, 2011; Liao *et al.*, 2015).

O desenvolvimento do HCC envolve, geralmente, o aparecimento de nódulos cirróticos pré- neoplásicos com displasia de baixo grau, estes nódulos se desenvolvem subsequentemente para nódulos displásicos de alto grau que podem se transformar em HCC em estágio inicial e deste para HCC avançado (Waller *et al.*, 2015).Classicamente os HCCs são tumores bem vascularizados com trabéculas largas (> 3 células), padrão acinar proeminente, pequenas alterações celulares, alteração citológica, atividade mitótica, invasão vascular, ausência de células de Kupffer e perda da rede de reticulina (Schlageter *et al.*, 2014).

2.4.3 Vias moleculares

O desenvolvimento do HCC inclui ainda alterações em eventos genéticos e epigenéticos que levam a uma ativação ou inativação anormal de múltiplas vias de sinalização celular, incluindo vias de proliferação, sobrevivência celular, diferenciação e angiogênese (Nishida e Goel, 2011).

A cascata de sinalização MAPK/ERK (*Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal regulated kinases*) é considerada uma via chave no desenvolvimento e progressão tumoral por estar relacionada à sobrevivência das células neoplásicas, metástase e resistência à quimioterápicos (Burotto *et al.*, 2014).

A cascata de sinalização tem início na estimulação de receptores de membrana, que promovem a ativação da proteína RAS (*Rat Sarcoma Viral*) por sua ligação à uma molécula de GTP (G*uanosine Triphosphate*). Esse proteína então recruta e ativa a RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) por fosforilação. A RAF dá continuidade à

sinalização celular pelo recrutamento e fosforilação de MEK (*MAP-ERK kinase*) e, posteriormente, de ERK (Samatar e Poulikakos, 2014). A ativação de ERK está relacionada a proliferação e a progressão do ciclo celular (Burotto *et al.*, 2014).

As mutações em RAS estão presentes em 30% dos casos de HCC que também apresentam RAF aumentada. Além disso, nessa neoplasia há uma maior produção de fatores de crescimento como EGF (*Epidermal growth factor*), PDGF-β (*Platelet-derived growth factor-β*) e TGF-α (T*ransforming growth factor-α*) que podem desencadear a sinalização da via da MAPK/ERK (Li, L. *et al.*, 2016).

A via da PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-kinase/Protein kinase B*) está intimamente relacionada ao controle do ciclo celular e proliferação (Terracciano *et al.*, 2019). O início da via é dado pela ligação de fatores de crescimento a receptores de membrana específicos que desencadeiam a ativação da proteína IRS (Insulin receptor substrate 1) por fosforilação. A sinalização prossegue por meio do recrutamento e ativação da PI3K e subsequente a fosforilação da AKT. A ativação da AKT culmina na ativação de complexos mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) que no núcleo irão atuar como fatores de transcrição crescimento, proliferação e progressão do ciclo celular (Memmott e Dennis, 2009). Essa cascata é contra regulada pela ação da proteína PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), que inibi a fosforilação da PI3K interrompendo assim o sinal desencadeado pelos fatores de crescimento (Lu *et al.*, 2016). A maior ativação dessa via já foi descrita em 40-50 % dos casos de HCC e está relacionada ao mau prognóstico, neoplasias menos diferenciadas e recidiva precoce (Matter *et al.*, 2014)

Outra via frequentemente mutada no HCC é a via da p53 (Niu *et al.*, 2016). A p53 funciona como um supressor de tumor e desempenha um papel central na regulação da ativação transcricional de genes envolvidos no reparo do DNA, controle da progressão do ciclo celular e apoptose (Wang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). A proteína p53 está normalmente presente em níveis baixos na célula, mas pode ter sua concentração aumentada devido a fatores como danos ao DNA, hipóxia, proteínas virais ou pela progressão do ciclo celular derivada da expressão de oncogenes (Chen *et al.*, 2003).

A regulação da p53, é mediada pela proteína MDM2 (*Murine Double Minute 2*) que se liga à p53 promovendo sua degradação pelo proteassoma. A inibição da MDM2 permite o acúmulo de p53 na célula e a modulação da expressão gênica. Dentre os genes regulados por p53 está o que codifica a proteína p21 (Meng *et al.*, 2014; Galanos *et al.*, 2016), uma proteína efetora na via da p53 que atua na transição da fase G1 para S no ciclo

celular (Galanos *et al.*, 2016) inibindo a progressão do ciclo celular e diminuindo o crescimento (Zhang *et al.*, 2009).

O HCC apresenta ainda alterações importantes na via de sinalização do NF-κB (*Transcription factor nuclear factor-κB*), um dímero que compreende as proteínas p65 e p50, e que é um importante regulador da resposta inflamatória no fígado. Além disso, o NF-κB é ativado em praticamente todas as doenças crônicas hepáticas e sua inativação genética resulta em fenótipos que incluem lesões espontâneas, fibrose e carcinogênese hepática (Luedde e Schwabe, 2011). Esta via pode ser ativada por infecções bacterianas e virais, bem como por citocinas pró-inflamatórias que ativam o receptor de TNF (*Tumor necrosis factor*) e fosforila as subunidades inibitórias IκBα, IκBβ, e IκBε, levando-o a sua degradação proteossômica e liberação do dímero NFκ-B que, no núcleo, atua como fator de transcrição de genes que codificam fatores anti-apoptóticos e citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-α, IL-1β e IL-6 (Maeda, 2010).

2.4.2 Hepatocarcinogênese experimental

O padrão do desenvolvimento de neoplasias de fígado em ratos é semelhante ao que se observa em humanos (Andersen *et al.*, 2010). Foram observadas semelhanças morfológicas, bioquímicas e biológicas em LPN e neoplasias hepáticas em humanos e roedores. Isto indica que, independentemente dos fatores etiológicos, os mesmos mecanismos básicos da hepatocarcinogênese em diferentes espécies podem ser similares (Farber e Sarma, 1987; Bannasch *et al.*, 2003; Feo *et al.*, 2008). Deste modo, o estudo da hepatocarcinogênese em modelos animais representa uma importante ferramenta para elucidar os aspectos genéticos, fisiopatológicos e ambientais importantes no desenvolvimento da neoplasia (De Minicis *et al.*, 2013). Um modelo experimental adequado deve ser prático para a investigação experimental, bem como apresentar características que definem a condição humana (Larter e Yeh, 2008; Sun e Karin, 2012).

A dietilnitrosamina (DEN) é um composto carcinogênico que é frequentemente utilizado para induzir experimentalmente fibrose hepática e hepatocarcinogênese animal. A DEN é metabolizada pelo citocromo P450 no fígado resultando na formação de íons etildiazônio (Kang *et al.*, 2007). Além disso, durante este processo há a formação de ROS como peróxido de hidrogênio e ânions superóxido. Os íons formados bem como as ROS podem reagir com os ácidos nucléicos, proteínas e lípidos causando dano celular e desencadeando o desenvolvimento da necrose centrolobular (Yanguas *et al.*, 2016).

O estudo de Schiffer e colaboradores (2005) se destaca no estudo da carcinogênese hepática por apresentar fibrose e cirrose no fígado e por seu tempo relativamente curto para o desenvolvimento de neoplasias. Neste estudo foi administrada a DEN intraperitoneal (i.p.) uma vez por semana na dose de 50 mg/kg de peso corpóreo durantes 16 semanas em ratos Wistar. Após 14 semanas, foi possível observar a presença de cirrose hepática e com 16 semanas nódulos malignos (Schiffer *et al.*, 2005). De maneira semelhante no estudo de Gang et al (2009) o mesmo protocolo apresentou com 8 semanas quadro de fibrose hepática, cirrose na 12ª semana e HCC após 16 semanas de administração de DEN (Gang *et al.*, 2009).

3. Nutrientes e compostos bioativos e carcinogênese hepática

3.1 Quimioprevenção

Devido às dificuldades no estabelecimento de estratégias mais eficazes para o tratamento do câncer, como o elevado grau de complexidade dessa doença (Chen e Lee, 2011) e desenvolvimento de resistência a fármacos anti-neoplásicos (Patel *et. al*., 2007; Bocci *et. al.*, 2012), há contínuos esforços para identificar como prevenir seu desenvolvimento.

Existem evidências de que a alimentação exerce papel fundamental na modulação de todos os estágios da carcinogênese, destacando-se entre outros fatores de risco (Surh, 2003; Ross, 2007). Nesse sentido, diversos estudos buscam elucidar como determinados alimentos e compostos bioativos presentes nos alimentos (CBAs) podem interferir no processo, com o objetivo de reduzir o risco de desenvolvimento de neoplasias (Sporn, 1976; Ross, 2007; Moreno *et al.*, 2016).

A quimioprevenção é definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos, com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de desenvolvimento de neoplasias (Sporn *et al.*, 1976; Shukla e Kalra, 2007). Diversos nutrientes e CBAs apresentam potencial ação quimiopreventiva na hepatocarcinogênese (Moreno *et al.*, 1995; Ong *et al.*, 2006; Furtado *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2018; Romualdo *et al.*, 2019). Dentre os inibidores da carcinogênese identificados até o momento, podem-se citar alguns derivados do metabolismo do mevalonato em

plantas, denominados isoprenóides, em função de sua promissora ação relatada na quimioprevenção (Moreno *et al.*, 1995; Mo e Elson, 2004; De Moura Espíndola *et al.*, 2005).

3.2 β – ionona

Um dos isoprenóides que merece destaque é a β-ionona (BI) que é um sesquiterpeno presente na estrutura molecular do retinol, β-caroteno e ácido retinóico e pode ser encontrada em uvas e aromatizantes de vinhos (Cardozo *et al.*, 2011). A BI possui diversas atividades dentre estas destacam-se sua ação quimiopreventiva e antinflamatória (Ansari e Emami, 2016).

A BI apresentou atividade quimiopreventiva em diversas células de câncer como de mama, colón, gástrico, melanoma e leucemia (Liu *et al.*, 2010). Além disso, este composto é capaz de inibir o processo de carcinogênese hepática (Scolastici *et al.*, 2014) e mamária (Liu *et al.*, 2010). Em trabalhos prévios, observou-se atividade quimiopreventiva da BI quando administrada durante as fases de iniciação e promoção inicial da hepatocarcinogênese em ratos *Wistar* submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH) (De Moura Espíndola *et al.*, 2005; Cardozo *et al.*, 2011; Scolastici *et al.*, 2014). Esta atividade da BI foi atribuída à inibição da proliferação celular nas LPN e nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN (De Moura Espíndola *et al.*, 2005). De forma semelhante, atividade quimiopreventiva da BI foi observada também quando administrada somente durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos *Wistar*, devido à redução da proliferação celular em LPN, à indução da remodelação de LPN (Cardozo *et al.*, 2011). Este isoprenóide foi capaz ainda de reduzir as pLPN bem como a proliferação celular e as células ovais na hepatocarcinogênese associada a modelo de DHGNA (Miranda *et al.*, 2019).

Além de atuar na carcionogênese este composto também apresenta atividade anti-inflamatória como demonstrado no estudo de Kang et al (2013) no qual a BI inibiu a expressão dos mediadores pró-inflamatórias NO, PGE 2 e TNF-α, bem como os seus genes reguladores, tais como iNOS e inibidores de COX-2 em BV2 células microgliais (Kang *et al.*, 2013). A BI demonstrou ainda reduzir a marcação de p65 em pLPN sugerindo uma diminuição dos níveis desta proteína (Scolastici *et al.*, 2014). Além disso, a BI demonstrou inibiu a invasão, migração e adesão celular pela inibição de MMPs e

hiperexpressão de TIMPs em células de hepatocarcinoma metastático humano (SK-Hep-1) (Huang *et al.*, 2012).

Deste modo, a BI parece atuar em mecanismos de desenvolvimento de HCC, bem como em mecanismos chaves do processo fibrótico. Assim, aventa-se a possibilidade da BI atuar como quimiopreventivo por reduzir processos inflamatórios modulando o desenvolvimento de cirrose hepática.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito quimiopreventivo da β-ionona na hepatocarcinogênese associada à fibrose hepática.

3.2 Objetivo Específico

- Avaliar o efeito da βI no desenvolvimento da fibrose hepática.

4. Material e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos, albinos, da linhagem *Wistar*, com pesos iniciais compreendidos entre 70 e 90 g e obtidos da colônia do biotério da Universidade de São Paulo (USP-SP). O experimento foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, após a devida aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais de Experimentação (número de protocolo: 507).

Os animais permaneceram durante todo o experimento nas seguintes condições: temperatura de 22°C ± 2°C e ciclo de iluminação claro-escuro de 12h, iniciando-se às 7hrs. Foram mantidos em gaiolas de polipropileno (não excedendo a 5 animais por caixa) com tampas de aço inoxidável e assoalho forrado com maravalha previamente esterilizada, trocada rotineiramente em dias alternados.

Os animais tiveram acesso à água filtrada e ração comercial peletizada para roedores de laboratório (Nuvilab CR-1; Nuvital Nutrientes S/A; Colombo/PR; Brasil) *ad libitum*, com controle de consumo de ração e massa corpórea diariamente. A ração foi constituída de carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e de aminoácidos. Os animais receberam o mesmo lote de ração até o término do experimento.

4.2 Protocolo experimental

Após um período de aclimatação de 7 dias, 82 animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais. Segue representação esquemática da distribuição dos animais, bem como, os diferentes protocolos de tratamento (**Figura 2**). Os animais foram eutanasiados em diferentes pontos seguindo modelo adaptado de Schiffer e colaboradores (2005), no qual é possível distinguir as fases de lesões fibróticas, cirrótica e HCC.

- Grupo Não tratado (NT): Composto de 5 animais que não foram submetidos a qualquer protocolo experimental e que permaneceram nas mesmas dependências dos demais grupos. Os animais foram eutanasiados em fases distintas: 10ª (P1), 14ª (P2) e 18ª (P3) semana (**Figura 2**).

- Grupo Óleo de Milho (OM): Composto de 38 animais que receberam durante todo o período experimental (18 semanas) óleo de milho (Mazola®; 0,25mL/100g peso corpóreo; p.c.), via intra-gástrica (i.g.) como controle da administração de BI. A partir da 3ª semana de experimento os animais receberam injeção intraperitoneal de DEN na dose de 50mg/Kg de p.c. semanalmente até a 16 ª semana. Os animais foram eutanasiados em três pontos distintos: 10ª (P1), 14ª (P2) e 18ª (P3) semana, para a avaliação dos diferentes estágios da fibrose e da hepatocarcinogênese (**Figura 2**).

- Grupo Beta- ionona (βI): Composto de 38 animais que receberam durante todo o período experimental (18 semanas) beta ionona (BI - 95%; Sigma, EUA; 16mg/100g p.c), via i.g. A partir da 3 ª semana de experimento os animais receberam injeção intraperitoneal de DEN na dose de 50mg/Kg de p.c. semanalmente até a 16 ª semana. Os animais foram eutanasiados em três pontos distintos: 10ª (P1), 14ª (P2) e 18ª (P3) semana, para a avaliação dos diferentes estágios da fibrose e da hepatocarcinogênese (**Figura 2**).

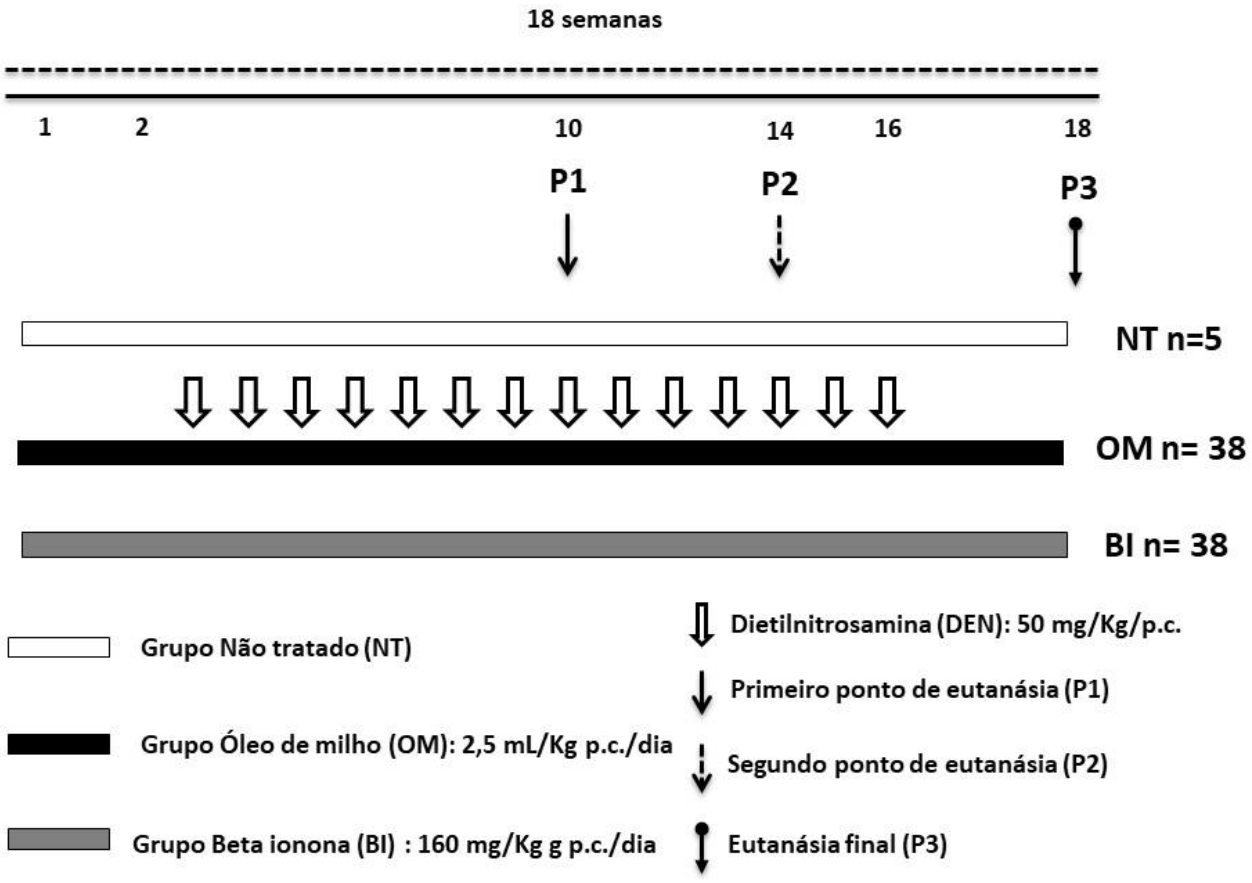


Figura 2: Delineamento experimental

4.3 Eutanásia dos animais e coleta das amostras

A eutanásia dos animais ocorreu por meio de asfixia por gás carbônico. Após, o fígado foi retirado, lavado em solução salina gelada a 0,9% e pesado em balança eletrônica digital, seguindo-se, então, o exame macroscópico do mesmo. Por fim, foram coletados fragmentos hepáticos fixados em formalina tamponada a 10% por 24 h e seguidos para processamento histológico ou congelados em nitrogênio líquido e conservados em -80ºC. Após o processamento histológico (material fixado), cortes de 5 µm de espessura foram obtidos e utilizados para coloração com hematoxilina e eosina (H&E), picrossirius e para marcação imunoistoquímica.

4.4 Exame Macroscópico dos Fígados

O fígado dos animais foi examinado individualmente quanto à presença de formações nodulares de tamanhos variados em sua superfície, bem como quanto a alterações na coloração em geral que se distinguiram do parênquima hepático (esbranquiçada ou amarelada).

4.5 Imageamento das neoplasias dos animais eutanasiados na 18ª semana (P3)

O imageamento dos animais, método utilizado na detecção de neoplasias, foi realizado nas dependências do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina/USP, no Centro de Medicina Nuclear - LIN43 em colaboração com o professor Dr. Fabio Luiz Navarro Marques e com a doutora Daniele de Paula de Faria.

Os animais dos grupos NT, OM e BI (n= 5) foram anestesiados com isoflurano 5% e mantidos em isoflurano 2-3% em O_2 para injeção do radiofármaco e durante aquisição das imagens. O radiofármaco, 2- [18F]-fluoro-2-desoxi-Dglucose [18F]FDG (aproximadamente 1 mCi em até 1mL) foi administrado via endovenosa na veia peniana sob anestesia e, então, metabolizado durante 45 minutos. Os animais foram então posicionados com o fígado no centro do campo de visão do equipamento PET (*Positron-emission tomography*) para pequenos animais (Triumph Trimodality, Gamma Medica Ideias, Califórnia USA) e as imagens foram adquiridas por 45 minutos, sendo 3 posições de 15 minutos cada.

Durante todo o tempo de aquisição das imagens os animais foram mantidos sob anestesia e aquecidos (maca aquecida) e tiveram os batimentos cardíacos monitorados. Após finalização da imagem PET, os animais foram reposicionados para aquisição da imagem de tomografia computadorizada (CT), no mesmo equipamento, com aquisição de 2-4 min utilizando 45 kVp e 400 µA. Após finalização das imagens, os animais sob anestesia profunda foram eutanasiados e tiveram o fígado coletado para análise histológica. As imagens de PET foram reconstruídas utilizando algorítmo OSEM (*Ordered Subsets Expectation Maximization*) 3D e as imagens de CT foram reconstruídas utilizando algorítmo FBP (*Filtered Back Projection).* As imagens foram analisadas no software PMOD®, onde VOIs (*volume of interest*) foram desenhados em torno dos nódulos identificados visualmente e os valores de captação máximos foram utilizados

para cálculo do SUV (*Standardized Uptake Value*) de cada lesão.

4.6 Quantificação de BI no fígado

O conteúdo de β-ionona nos tecidos foi determinado pelo professor Dr. Eduardo Purgatto do Departamento de ciências dos Alimentos da FCF/USP, de acordo com Su et al. (2004) com adaptações. As amostras hepáticas provenientes de 4 animais de cada grupo foram homogeneizadas em um aparelho do tipo Potter com 200 µL de etanol mais 10 ng de metil β-ionona (padrão interno – PI). Os homogenatos foram centrifugados por 15 minutes a 10.000 g (4°C). Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para *vials* de injeção, dos quais 3 µL foram injetados um sistema de cromatografia à gás (modelo HP6890) acoplado a um detector seletivo de massas (modelo HP5973). A coluna empregada foi uma SupelcoWax 10 (30 mts x 0.25 mm diâmetro interno, 0.25 mm de espessura de filme). A injeção foi feita sem divisão de amostra (Splitless) com temperatura de 200°C. O gás de arraste utilizado foi hélio a um fluxo constante de 1ml / min. A temperatura do forno foi inicialmente mantida a 50°C por 3 minutos e aumentada até 250°C a 20°C/minuto. O monitoramento do efluente da coluna foi feito em um detector do tipo quadrupolo usando uma fonte de ionização do tipo impacto de elétrons a 70 eV com temperatura de 230°C. Os íons monitorados foram 177 e 206 para a β-ionona e 135 e 191 para o PI (padrão interno). Uma curva de calibração foi montada injetando-se de 0,1 a 10 ng de BI, em *vials* contendo 10 ng de PI cada. A relação de áreas BI /PI foi montada utilizando o cromatograma extraído para o íon 177. Os cálculos do conteúdo de β-ionona foram baseados na mesma relação.

4.7 Análise histopatológica

4.7.1 Grau de fibrose por H&E dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3)

Nos cortes de fígado corados com H&E foi avaliado o grau de fibrose em escala de I a IV de acordo com critérios estabelecidos por Bruck e colaboradores (Bruck *et al.*, 2007). Esta avaliação foi realizada pelo Professor Dr. Luis Fernando Barbisan do Departamento de Morfologia da UNESP/Botucatu.

4.7.2 Identificação e avaliação de tipos de neoplasias dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3)

Os fígados dos animais foram avaliados quanto a presença e alterações morfológicas das neoplasias em H&E, que foram classificadas como adenoma hepatocelular (ADH), colangiocarcinoma (CCA) e carcinoma hepatocelular – *low* e *high* (HCC- L; HCC- H). Esta avaliação foi realizada pelo Professor Dr. Luis Fernando Barbisan do Departamento de Morfologia da UNESP/Botucatu.

4.7.3 Avaliação da apoptose no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

Os hepatócitos em apoptose e corpos apoptóticos foram quantificados pelo método de H&E (Levin, 1998) utilizando-se microscópio (Axio Imager M2; Carls Zeiss; Alemanha) (**Anexo 5B**). A leitura foi realizada varrendo-se 10 campos por lâmina (cerca de 1000 a 2000 hepatócitos) e o resultado foi expresso em porcentagem (índice apoptótico).

4.8 Marcação da coloração de picrossírius no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3)

As fibras colágenas dos tipos I e III foram avaliadas pela marcação de picrossirius (**Anexo 5D**). A quantificação da área ocupada por fibras de colágeno tipos I e III coradas por picrossírius foi realizada utilizando-se câmera digital acoplada ao microscópio AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha) e software de análise de imagem Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, USA).

4.9 Imunoistoquímica

4.9.1 Imunoistoquímica para GST-P, PCNA, α-SMA e CD38 no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

Fragmentos representativos do fígado foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato 0,01M (pH 6,0) a 120ºC por 5 min em uma câmara de pressão Pascal (Dako Cytomation, Dinamarca). Posteriormente, foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena pela incubação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 1% por 20 minutos. As lâminas passaram pelo bloqueio de proteínas inespecíficas por incubação em solução de leite em pó desnatado (Molico®) à 3% em PBS 1% por uma hora.

Em seguida as lâminas foram incubadas com anticorpos primários específicos anti-GST-P (1:1000; MBL, Japão), anti-PCNA (diluição 1:100; Cell Signaling, EUA), anti-α-SMA (diluição 1: 500, Abcam, UK) e anti-CD68 (diluição 1: 1000, Abcam, UK) em câmara úmida 4 ° C por 16 horas. As lâminas marcadas com anti-GST-P e anti-PCNA foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado (anti –mouse/rabbit) (DAKO, Dinamarca) por uma hora. As lâminas marcadas com anti-CD38 e anti-α-SMA foram incubadas por 1 hora ou por 20 minutos com polímero-HRP (EasyPath - Erviegas, Brasil) de uma etapa. As reações de imuno-histoquímica foram reveladas com o cromógeno 3'3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich, EUA) e contrastadas com hematoxilina de Harris. Para montagem das lâminas foi utilizado *Faramount Aqueous* (Dako, Dinamarca).

4.9.1.2 Avaliação das LPNs GST-P positivas dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3)

O número (n/cm^2), tamanho médio (mm^2) e a porcentagem da área do corte ocupada por LPNs GST-P positivas (**Anexo 5A**) (Dagli *et al.*, 1998), bem como a área total dos fragmentos hepáticos foram determinados utilizando-se o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

4.9.1.3 Avaliação da proliferação celular dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

A proliferação celular foi avaliada pela contagem de núcleos marcados para PCNA positivos em fase S (fortemente marcados) no *surrounding* e em LPNs varrendo-se 10-20 campos por lâmina (cerca de 1000 a 2000 hepatócitos). Para essa análise utilizou-se o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha) e Image J (National Institutes of Health, EUA). O resultado foi expresso em porcentagem (índice de proliferação celular) (**Anexo 5E**).

4.9.1.4 Avaliação e quantificação da marcação de CD38 e α-SMA dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

Para a análise semiquantitativa de CD68, 10 campos aleatórios no fígado foram avaliados compreendendo tanto áreas portais quanto centrolobulares. Os macrófagos CD68+ (**Anexo 5F**) foram contados e divididos pela área do fígado (mm²). Essas análises foram realizadas nos softwares Olympus CellSens (Olympus Corporation, Japão) e Image J (National Institutes of Health, EUA).

Na análise de α-SMA (**Anexo 5C**) utilizou-se o software Leica QWin V3 (Leica Microsystems, Alemanha), também avaliando-se 10 campos aleatórios que compreendiam áreas portais e centrolobulares.

4.10 Processamento de zimografias para MMP-2 e MMP-9 dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

Foram utilizados fragmentos hepáticos (~ 300 mg) congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados a –70°C. O processamento da zimografia foi realizado seguindo-se o protocolo descrito por Kossakowska et al. (1998), com modificações. Resumidamente, os fragmentos hepáticos foram homogeneizados em tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 7,6; NaCl 0,2 M; Triton X-100 1%; CaCl2 10 mM; coquetel de inibidor de protease 2µl/100ml Sigma CO, Sant Louis USA) na proporção de 30 mg de tecido/100µl de tampão e mantidos a 4ºC durante 2 horas. Após este procedimento, o material extraído foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos a 4ºC e o sobrenadante coletado para dosagem de proteína, que foi realizada pelo método de

Bradford em 595 nm utilizando-se leitor de Elisa.

Em seguida, as amostras e um padrão de peso molecular (Biorad, USA – 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 Kda) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% contendo 0,1% de gelatina, em condições não-redutoras (2 horas a 100 V a 4 ºC). Após a corrida, os géis foram lavados em Triton X-100 2,5% (2x de 15 min) e em tampão tris-HCl 50mM, pH 7,5 (2x de 5 min). Posteriormente, os géis foram incubados na mesma solução tampão tris-HCl contendo 5 mM de CaCl2 e 1 µM de ZnCl2 por 22 horas a 37ºC.

O peso molecular relativo das bandas foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular que foi utilizado na corrida eletroforética. Análises semiquantitativas foram realizadas por densitometria das bandas utilizando-se software Quantity-one (BIO-RAD, USA).

4.11 *Western blotting* na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

Proteína total foi extraída com tampão de lise (NP-40 1%, NaCl 150mM, Tris 500mM pH=8) adicionado de inibidores de fosfatase e proteinase 0,001% (Sigma) e PMSF 1mM e quantificadas com Bio Rad protein Assay (Bio-Rad, USA). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), transferidas para membrana de nitrocelulose com Trans-Blot® TurboTM Blotting System (Bio Rad, USA) e bloqueadas com Blotting-Grade Blocker (Bio Rad, USA). As membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários específicos: anti-p65 (diluição 1:1000, Cell Sinagling, USA), anti-p53 (diluição 1:1000, Cell Sinagling, USA), anti-p21 (diluição 1:200, Santa Cruz, USA), anti-AKT fosforilada (diluição 1:2000, Cell Sinagling, USA), anti-AKT total (diluição 1:2000, Cell Sinagling, USA), anti-ERK1/2 fosforilada (diluição 1:1000, Cell Sinagling, USA), anti-ERK1/2 total (diluição 1:1000, Cell Sinagling, USA), anti-PTEN fosforilada (diluição 1:1000, Cell Sinagling, USA) e anti-PTEN total (diluição 1:1000, Cell Sinagling, USA).

Em seguida foi realizada marcação com o anticorpo secundário especifico (anti-rabbit ou anti-mouse 1:10000, Santa Cruz, USA). Na sequência ocorreu a incubação com o segundo anticorpo primário anti β-actina (1:5000, Sigma, EUA), que consiste em um controle constitutivo, e seu anticorpo secundário específico (anti-mouse 1:10000, Santa Cruz, USA).

A imunodetecção foi realizada usando sistema de quimiluminescência ECL (GE

Healthcare, UK) e o sinal captado pelo sistema de aquisição de imagem ImageQuant 400 (GE Healthcare, UK). A densidade ótica das bandas foi analisada utilizando o software Quantity-one (BIO-RAD, USA).

4.12 Avaliação das concentrações hepáticas de hidroxiprolina dos animais eutanasiados na 14ª semana (P2)

A determinação das concentrações de hidroxiprolina foi realizada segundo kit comercialmente disponível MAK008 (Sigma-Aldrich, EUA). Resumidamente, aproximadamente 10 mg de fígado foram homogeneizados em 100µl de água. Posteriormente, adicionou-se 100µl de solução concentrada de ácido clorídrico (HCL, ~12M) para digestão a 120º por 3 horas, as amostras foram então centrifugadas, o sobrenadante coletado e transferido para placa de 96 poços para secagem em estufa 60ºC. Em seguida foi adicionado em cada poço 100µl de solução de Cloramina T/Tampão de Oxidação (MAK008A-008B; Sigma-Aldrich, EUA) e a placa foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 100µl de solução de DMAB/Ácido perclórico-Isopropanol (MAK008C-D; Sigma-Aldrich, EUA) foi acrescentado a cada poço e incubado por 90 minutos em estufa a 60ºC. A placa foi analisada em leitor de Elisa (Biotek Synergy H1, EUA) na absorbância de 560 nm. Para os cálculos das concentrações utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\mathbf{S_a/S_v = C}$$

Onde:

S_a é dada pela equação:

S_a = [(A560) / (A560) controle – (A560) amostra] x 0,4µg.

S_a = Concentração de hidroxiprolina de uma amostra desconhecida

S_v = Volume da amostra adicionada no poço

C= Concentração de hidroxiprolina na amostra

4.13 Análise estatística

Os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (teste de Brown-Forsythe). Quando atendidos esses requisitos, as comparações foram realizadas com o teste paramétrico *t* de Student. Quando não foi observada distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, adotou-se teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney. Para a análise macroscópica foi utilizado o teste exato de Fischer. Em todos os casos foi adotado o nível de significância de 5%. O software utilizado foi o STATISTICA 8.0.

5. Resultados

5.1 Evolução de peso corporal

Os animais dos grupos OM e BI não demonstraram diferenças em relação ao ganho de peso corporal durante todo o experimento. No entanto, como esperado o grupo NT, que não foi submetido a nenhum protocolo experimental, apresentou maior ganho de peso quando comparado aos demais grupos a partir da 5ª semana (**Figura 3**).

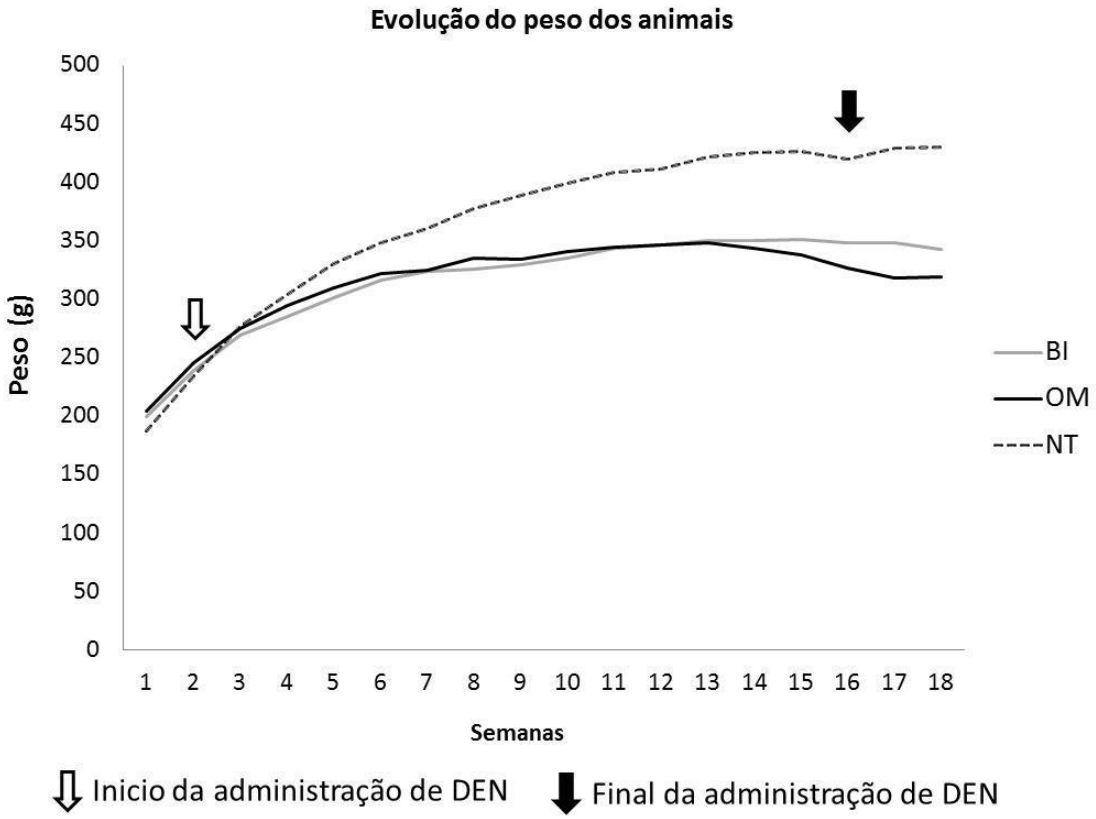


Figura 3: Evolução do peso corpóreo dos animais dos grupos: não tratado (NT), submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI).

5.2 Consumo de ração

A evolução do consumo de ração está representada na **Figura 4**.Não foi observada diferença entre a ingestão de ração dos animais pertencentes aos grupos OM e BI. Além disso, constatou-se redução no consumo médio de ração por parte desses animais nos três grupos experimentais após a 2ª semana quando se iniciou a administração de DEN. O grupo NT demonstrou maior consumo médio de ração em relação ao demais grupos.

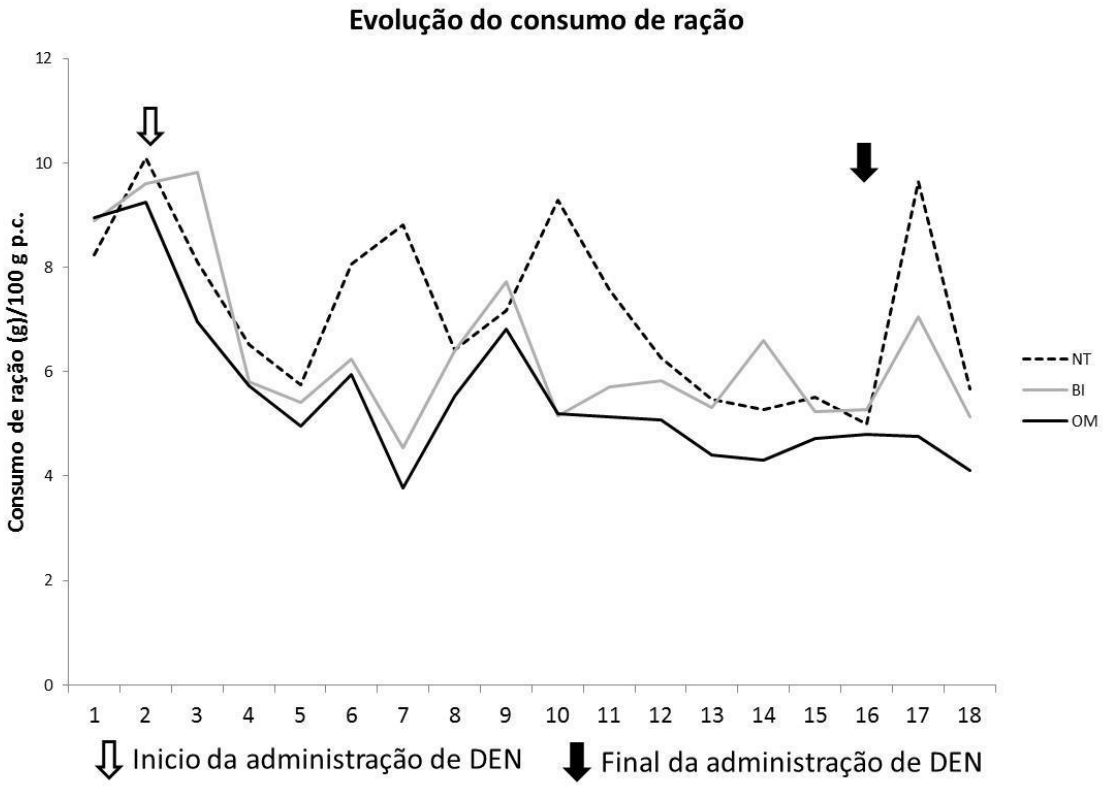


Figura 4: Evolução do consumo médio de ração dos animais dos grupos: não tratado (NT), submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI).

5.3 Pesos iniciais, finais, hepáticos absoluto e relativo dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3)

Não houve diferença entres os grupos BIP1 e OMP1 quanto a seus pesos corpóreos iniciais e finais ($p \geq 0,05$). Porém o grupo BIP1 apresentou maiores ($p < 0,05$) pesos hepáticos absoluto e relativo quando comparado ao grupo OMP1. De maneira semelhante, no ponto 2 não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) entre os pesos iniciais e finais dos animais dos grupos BIP2 e OMP2. Entretanto, o grupo BIP2 apresentou menores ($p < 0,05$) pesos hepáticos absoluto e relativo quando comparado ao grupo OMP2. (**Tabela 2**). Em relação aos pesos iniciais, finais, hepáticos absoluto e relativo não foi possível observar diferenças ($p \geq 0,05$) entre os grupos OMP3 e BIP3.

Tabela 2: Pesos corpóreos iniciais e finais e hepáticos absoluto e relativo dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3).

Grupo	Nº de animais	Peso inicial	Peso Final	Peso Hepático Absoluto	Peso hepático Relativo
OMP1	7	76,41±1,23	345,27±17,14	7,40±0,34	2,15±0,03
BIP1	5	76,06±1,90	344,26±16,54	9,526±0,64a	2,76±0,04a
OMP2	13	78,5±2,02	350,55±10,83	20,26±1,30	5,74±0,32
BIP2	10	77,40±2,77	352,33±13,85	15,72±0,83b	4,48±0,21b
OMP3	9	78,33±3,8	321,82±7,32	26,86±2,70	8,13±0,52
BIP3	11	76,40±2,69	352,91±9,41	24,28±2,81	7,14±0,74

Dados expressos como média ± EPM; a – diferente de OMP1, b – diferente de OMP2 ($p < 0,05$), teste *t* de Student para amostras independentes.

5.4. Macroscopia

Não foram observados nódulos macroscópios nos animais dos grupos OMP1 e BIP1 (**Anexo 2A-B**). No entanto, observou-se incidência de 100% de nódulos tanto nos animais dos grupos OMP2 como nos do grupo BIP2 eutanasiados na 14ª semana (**Anexo 2C-D**) (**Tabela 3**). Não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) em relação ao número médio de nódulos entre os animais dos grupos OMP2 e BIP2. Entretanto, observou-se que o número total de nódulos macroscópicos foi menor ($p < 0,05$) nos animais do grupo BIP2 quando comparados aos do no grupo OMP2. Os animais dos grupos OMP3 e BIP3 também demonstraram incidência de 100%, porém sem diferenças ($p \geq 0,05$) em relação ao número médio e ao número total de nódulos macroscópicos (**Anexo 2E-F**) (**Tabela 3**).

Tabela 3: Incidência, número médio e número total de nódulos macroscópicos dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3).

Grupo	Nº de animais	Incidência	Número médio	Nº total de nódulo Macroscópicos
OMP1	7	0	-	-
BIP1	5	0	-	-
OMP2	13	100%	22,76	296
BIP2	10	100%	13,8	138b
OMP3	9	100%	3,09	25
BIP3	11	100%	2,77	34

Dados expressos como média, b – diferente de OMP2 ($p < 0,05$) teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

5.5 Quantificação hepática de βI dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3)

Em relação às concentrações hepáticas de βI observou-se que os grupos B1P1, B1P2 e B1P3 apresentaram concentrações maiores ($p<0,05$) que a de seus respectivos controles OMP1, OMP2 e OMP3 (**Figura 5**).

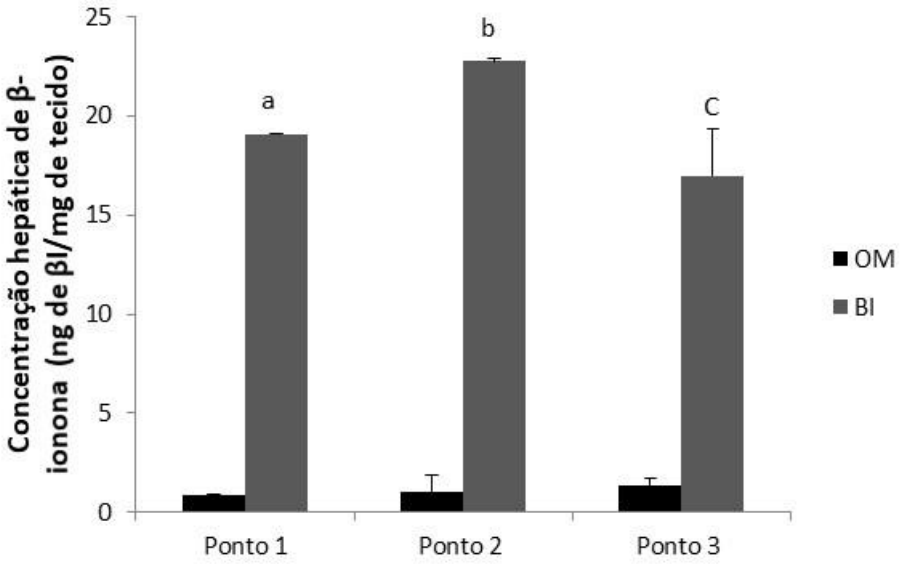


Figura 5: Concentração hepática de β-ionona dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1), 14ª (P2) e 18ª semana (P3); n= 5. Dados expressos como média ± EPM. a – diferente de OMP1, b- diferente de OMP2, c-diferente de OMP3 ($p<0,05$) teste *t* de Student para amostras independentes.

5.6. Grau de fibrose dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3)

Não foram observadas diferenças em relação ao grau de fibrose ($p\geq0,05$) apresentado pelos animais dos grupos OMP1 e BIP1 (**Figura 6**). Porém os animais do grupo BIP2 demonstraram menor ($p<0,05$) grau de fibrose quando comparado ao do

grupo OMP2. De maneira semelhante, os animais do grupo BIP3 apresentaram menor ($p<0,05$) grau de fibrose quando comparados aos do grupo OMP3 (**Figura 6**).

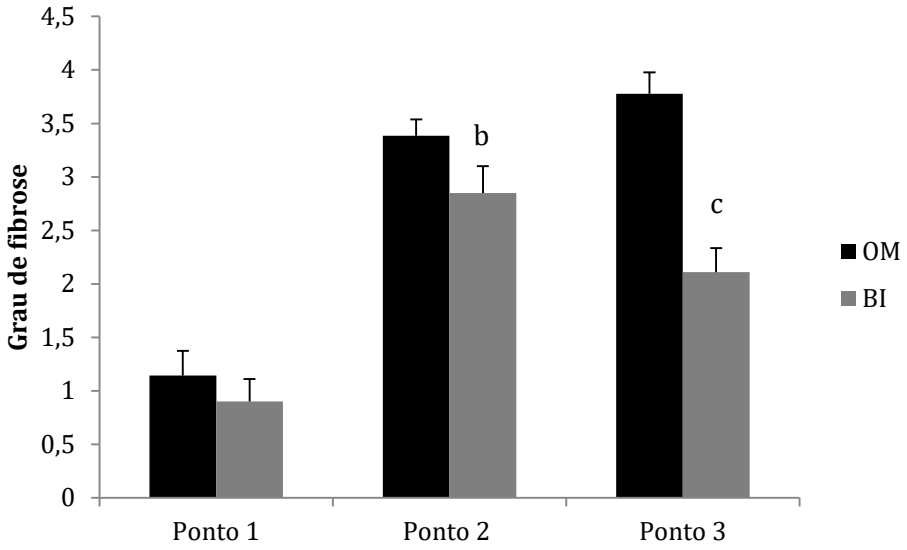


Figura 6: Grau de fibrose hepática dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1; n=5-7), 14ª (P2; n=10-13) e 18ª semana (P3; n=9-11). Dados expressos como média ± EPM.b-diferente de OMP2, c-diferente de OMP3 ($p<0,05$) teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

5.7. Avaliação das neoplasias

5.7.1 Imageamento das neoplasias observadas nos animais eutanasiados na 18ª semana (P3)

As células neoplásicas, de modo geral, consomem maior quantidade de glicose quando comparadas às células normais de tecidos adjacentes. O análogo da glicose, 18F-FDG, é um indicador da utilização e do grau de funções específicas no câncer, facilitando o diagnóstico de lesões suspeitas com grande especifidade (Park *et al.*, 2015). Não foram observadas diferenças ($p\geq0,05$) quando ao número de neoplasias entre os grupos OMP3 e BIP3 (**Anexo 2G-H**).

5.7.2.Classificação das neoplasias observadas nos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3)

Não foram observadas neoplasias nos animais dos grupos OMP1, BIP1, OMP2 e BIP2 (**Tabela 4**). No entanto, na 18ª semana (P3) foram observadas neoplasias benignas (ADH) e malignas (CCA, HCC – L e HCC - H) tanto no grupo OMP3 quanto no BIP3. Não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) em relação ao número de neoplasias entre os grupos OMP3 e BIP3. A incidência de HCC – L foi maior ($p < 0,05$) no grupo BIP3 comparado ao grupo OMP3. Em relação ao número de ADH, CCA e HCC-H não observou-se diferenças ponto de vista estatístico ($p \geq 0,05$) entre os grupos OMP3 e BIP3 (**Tabela 4**).

Tabela 4: Incidência de neoplasias observadas no fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3).

Grupo	Nº de animais	Neoplasias				
		ADH	CCA	HCC - L	HCC - H	Total
OMP1	7	0	0	0	0	0
0BIP1	5	0	0	0	0	0
OMP2	13	0	0	0	0	0
BIP2	10	0	0	0	0	0
OMP3	9	5 (22,72 %)	3 (13,63 %)	2 (9,09 %)	12 (54,54%)	22
BIP3	11	6 (16, 21 %)	4 (10,81 %)	16 (43,24%)a	9 (24,32 %)	35

Dados expressos como média a – diferente de OMP3 ($p<0,05$) teste *t* de Student para amostras independentes.

5.8 Análise de LPNs GST-P positivas dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3)

Em relação as LPNs GST-P positivas, observou-se no grupo BIP1 menor ($p<0,05$) número e porcentagem da área do corte ocupada por LPNs em comparação ao grupo OMP1. Não houve diferença ($p \geq 0,05$) no tamanho médio das LPNs entre os grupos OMP1 e BIP1 (**Tabela 5)**. O grupo BIP2 apresentou menor ($p<0,05$) tamanho médio das

LPNs e porcentagem da área do corte ocupada por LPNs quando comparado ao seu respectivo controle OMP2 (**Tabela 5)**. Não foi observada diferença estatística ($p \geq 0,05$) em relação ao número de LPNs entre os grupos OMP2 e BIP2. Não foi observada diferença do ponto de vista estatístico ($p \geq 0,05$) quanto ao número, tamanho médio e porcentagem da área do corte positiva para GST-P entre os grupos OMP3 e BIP3. A marcarção positiva no ponte 3 compreendeu também regiões de lesões neoplásicas e não apenas LPNs.

Tabela 5: Análise morfométrica para marcação com GST-P, demonstrando número de LPN por cm^2, tamanho médio das LPNs (mm^2) e porcentagem de área hepática ocupada pelas mesmas no fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3).

Grupos	Número de LPNs GST-P positivas (cm2)	Tamanho médio de LPNs GST-P positivas (mm2)	% de área do corte ocupada por LPNs GST-P positivas (%)
OMP1	45,74±8,99	0,051±0,013	2,73±0,81
BIP1	13,65±5,14ª	0,018±0,08	0,45±0,22a
OMP2	123,47±2,53	0,52±0,16	61,02±1,03
BIP2	165,83±3,00	0,24±0,14b	35,59±1,43b
OMP3	101,94±17,54	0,78±0,14	65,78±6,98
BIP3	105,60±41,86	0,64±0,23	45,93±2,18

Dados expressos como média ± EPM; n: 5-7; a – diferente de OMP1 ($p<0,05$) teste *t* de Student para amostras independentes e b- diferente de OMP2 ($p<0,05$) teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

Embora a BI tenha demostrado efetiva ação quimiopreventiva nas etapas iniciais da hepatocarcinogênese (Ponto 1 e Ponto 2), no modelo adotado não foi possível comprovar o mesmo efeito na fase mais avançada do processo (Ponto 3). Por este motivo, as análises subsequentes que procuraram elucidar os mecanismos de ação desse

isoprenóide, foram realizadas apenas nos pontos em que a BI demonstrou sua eficácia quimioprotetora, ou seja, nas etapas iniciais da hepatocarcinogênese (Ponto 1 e 2).

5.9 Avaliação da proliferação celular no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

Não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) na proliferação celular no *surrounding* e nas LPNs entre grupos OMP1 e BIP1. No entanto, no ponto 2 houve menor ($p < 0,05$) índice de proliferação de células na fase S no interior das LPNs do grupo BIP2 em relação ao seu controle OMP2. Observou-se ainda maior ($p < 0,05$) proliferação celular nas LPNs quando comparadas ao *surrounding* (S) no OMP2. De maneira semelhante, as LPNs do grupo BIP2 também demonstraram maior ($p < 0,05$) proliferação celular quando comparadas ao *surrounding* (**Figura 7**).

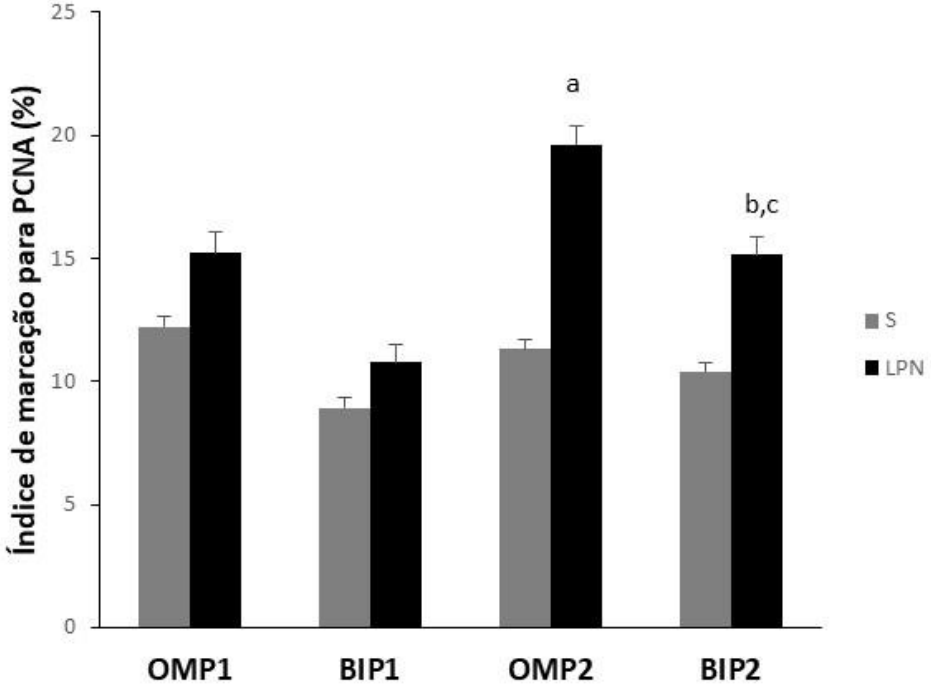


Figura 7: Quantificação do índice de proliferação celular marcadas com PCNA do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM, n: 5-7; a- diferente de OMP2 S (surrounding) ($p < 0,05$) teste *t* de Student para amostras independentes, b- diferente de OMP2 PNL e c- diferente de BIP2 S (surrounding) ($p < 0,05$) teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

5.10 Avaliação da apoptose no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

Não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) entre os índices apoptóticos dos grupos BIP1 e BIP2 quando comparado aos seus respectivos controles grupos OMP1 e OMP2 (**Figura 8**).

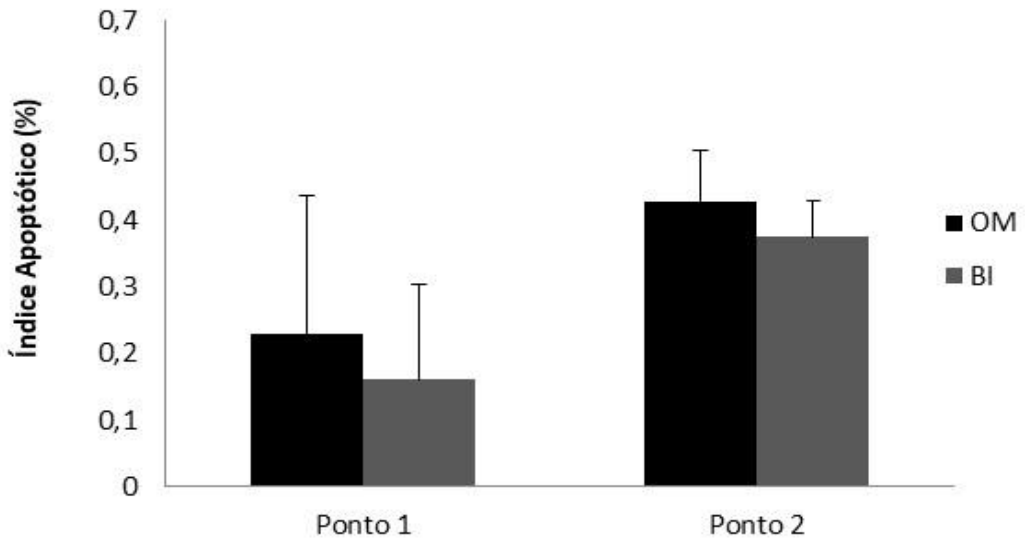


Figura 8: Quantificação do índice apoptótico do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM; n: 5-7.

5.11 Análise de macrófagos no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

Foi possível observar menor ($p<0,05$) número de macrófagos positivos para CD68+ (**Anexo 5F**) no grupo BIP1 quando comparado ao grupo OMP1. Em relação ao ponto 2, não houve diferenças entre os grupos OMP2 e BIP2 ($p\geq0,05$) quanto ao número de macrófagos CD68+ (**Figura 9**).

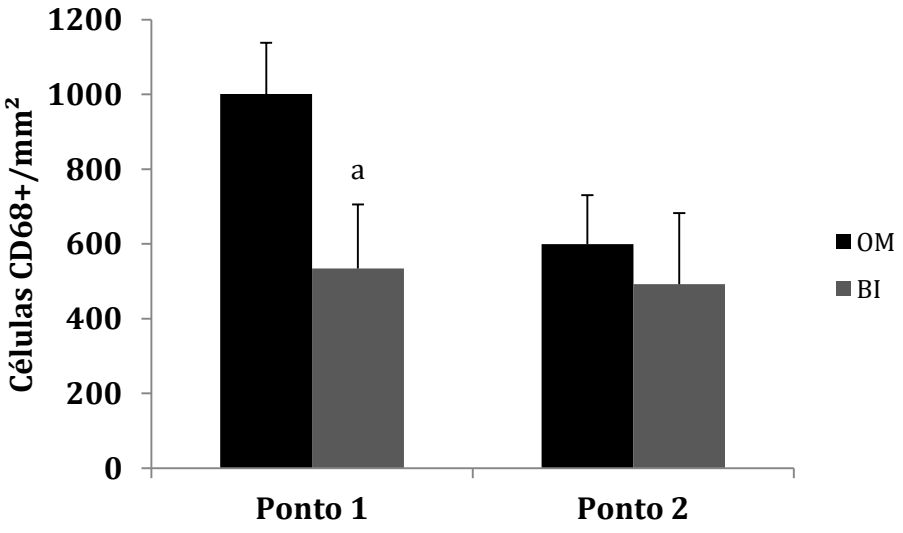


Figura 9: Quantificação do número de células CD68+/mm² do fígado dos animais submetidos à modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM, n:5-6; a – diferente de OMP1 ($p<0,05$) teste *t* de Student para amostras independentes.

5.12 Análise de picrosirius no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P2)

Embora não tenha sido encontrada diferença (p≥0,05) entre grupos BIP1 e OMP1 em relação a porcentagem de área marcada para picrosírius no ponto 1, foi observado que o grupo BIP2 apresentou menor (p <0,05) porcentagem de área marcada em relação ao seu respectivo controle OMP2 (**Figura 10**). No ponto 3, o grupo BIP3 também demonstrou menor (p <0,05) porcentagem de área marcada por picorsirius quando comparada ao grupo OMP3.

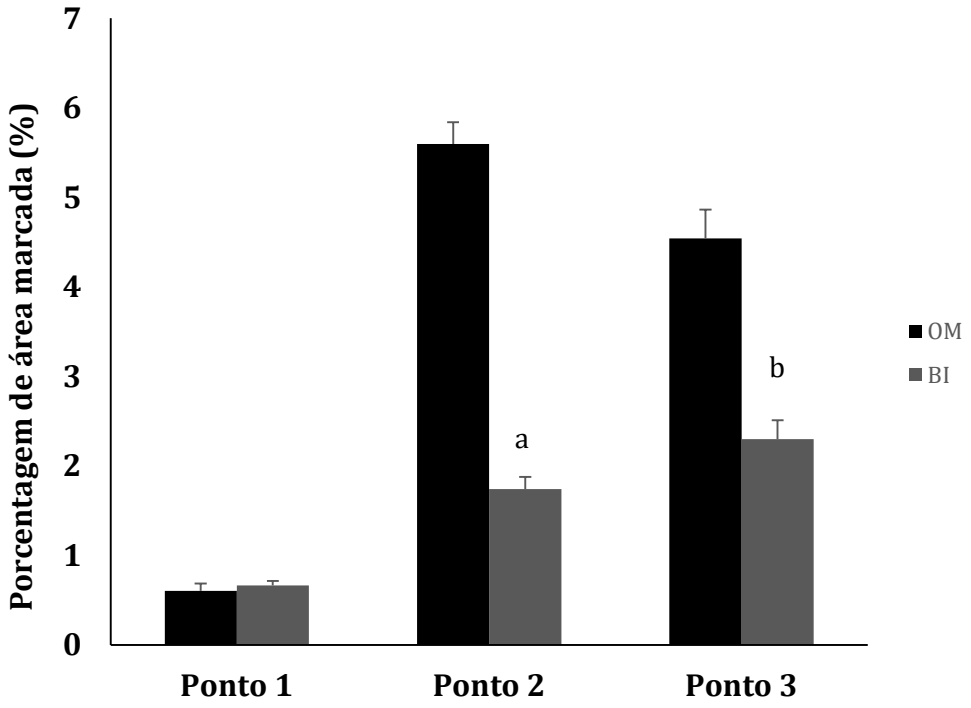


Figura 10: Quantificação da área marcada por picrosirius do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM, n: 5-6; a – diferente de OMP2 (p<0,05), b-diferente de OMP3 teste *t* de Student para amostras independentes.

5.13 Análise de α – SMA no fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

Embora não tenha sido observada diferença (p≥0,05) entre os grupos OMP1 e BIP1 quanto a porcentagem de área marcada por α–SMA (**Anexo 5C**), no ponto 2 o grupo BIP2 apresentou menor (p<0,05) porcentagem de área positiva para α–SMA quando comparada ao seu controle OMP2 (**Figura 11**).

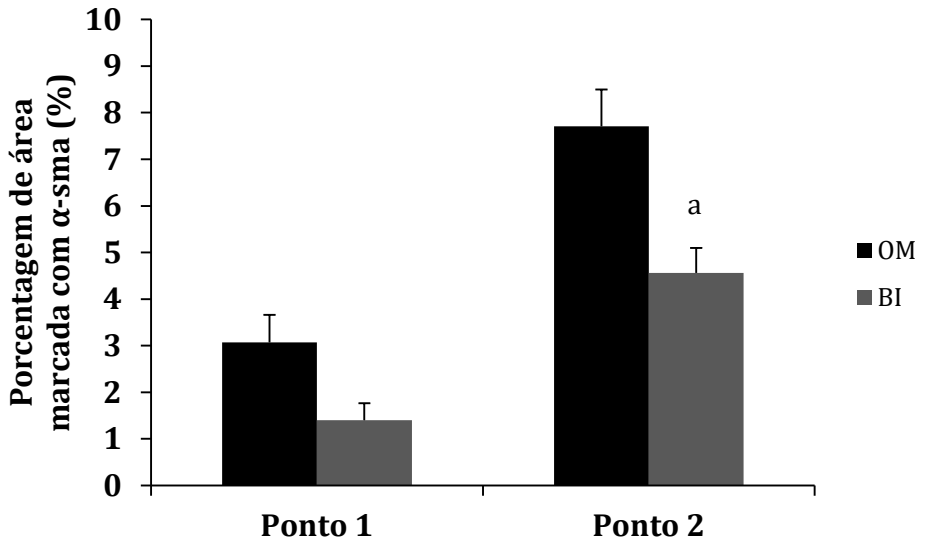


Figura 11: Quantificação da porcentagem de área positiva para α – Sma do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM, n:5-6; a – diferente de OMP2 (p<0,05) teste *t* de Student para amostras independentes.

5.14 Zimografia do fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

Foi possível identificar as MMPs 2 e 9 e suas subunidades (**Anexo 6**). Observou-se que o grupo BIP1 apresentou menor atividade da banda ativa da MMP-9 em relação ao seu controle OMP1 (p<0,05). Em relação as MMPs 2 (pro e ativa) e a subunidade pro-MMP9 não observou-se diferenças do ponto de vista estatístico (p≥0,05) entre os grupos OMP1 e BIP1 (**Figura 12**). Não foram observadas diferenças (p≥0,05) em relação as

MMPs 9 (pro e ativa) e a subunidade MMP 2 ativa entre os grupos OMP2 e BIP2. No entanto, houve uma diminuição ($p<0,05$) da pro MMP2 no grupo BIP2 quando comparado ao grupo OMP2 (**Figura 12**).

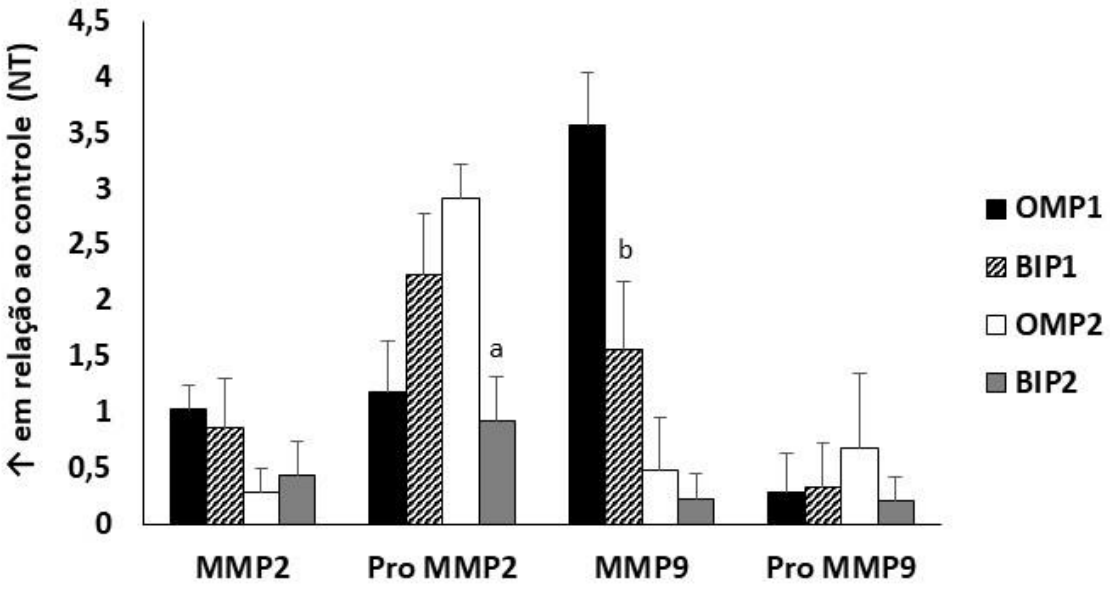


Figura 12: Densitometria da atividade proteolítica das MMP-2 (Pro e ativa) e MMP-9 (Pro e ativa) do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM; n=4; a diferente de OMP2, b – diferente de OMP1 ($p<0,05$), teste *t* Student para amostras independentes.

5.15 Concentrações hepáticas de hidroxiprolina dos animais eutanasiados na 14ª semana (P2)

Foram observadas menores concentrações de hidroxiprolina ($p<0,05$) no fígado dos animais do grupo BIP2 quando comparados aos dos animais do grupo OMP2 (**Figura 13**).

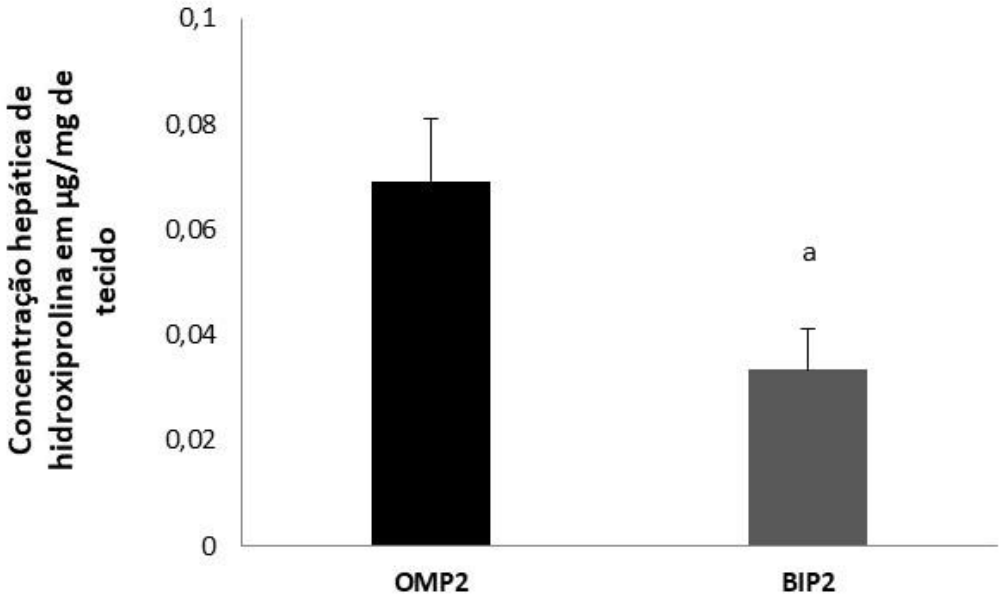


Figura 13: Concentração hepática de hidroxiprolina no fígados dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM; n=5; a – diferente de OMP2 ($p<0,05$) teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

5. 16 *Westen blot* do fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1) e 14ª semana (P2)

5.16.1 Quantificação da proteína p21

A concentração da proteína p21 nos animais do grupo BIP1 foi menor ($p < 0,05$) do que a observada no grupo OMP1. Por outro lado, o grupo BIP2 apresentou maiores ($p<0,05$) níveis desta proteína quando comparado ao seu respectivo controle OMP2 (**Figura 14**).

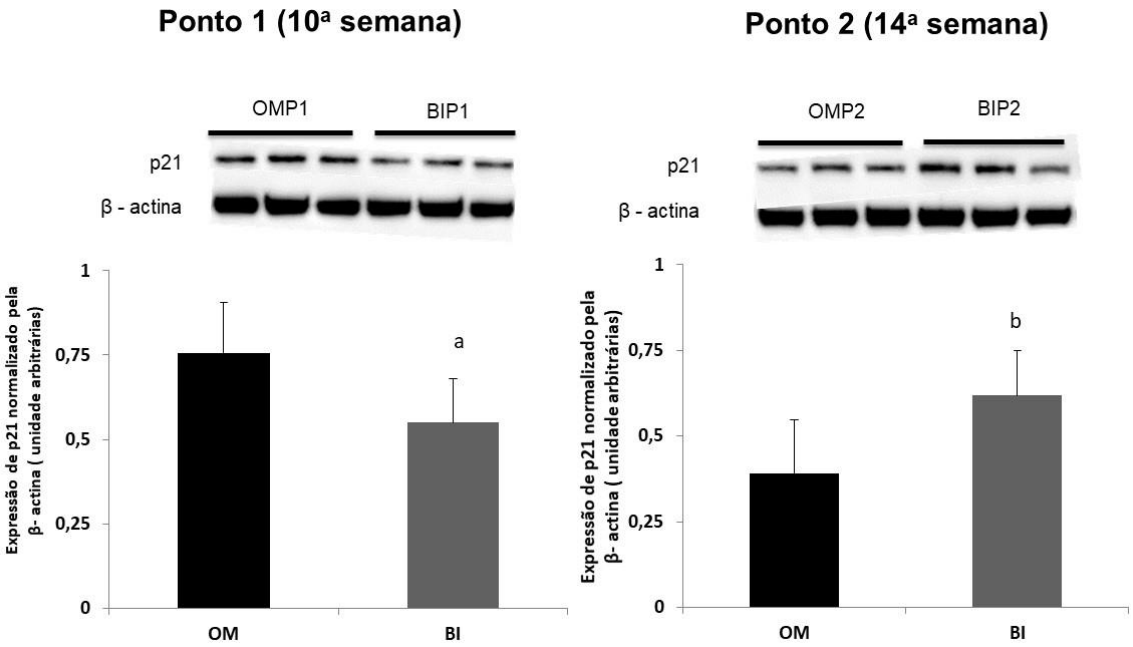


Figura 14: Imagem representativa de *western blot* e densitometria de p21 e β-actina do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM; n=4-5; a – diferente de OMP1, b – diferente de OMP2 ($p<0,05$) teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

5.16.2 Quantificação da proteína p53

Não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) na concentração da proteína p53 entre os grupos BIP1 e OMP1, ou entre os grupos BIP2 e OMP2 ($p \geq 0,05$) (**Figura 15**).

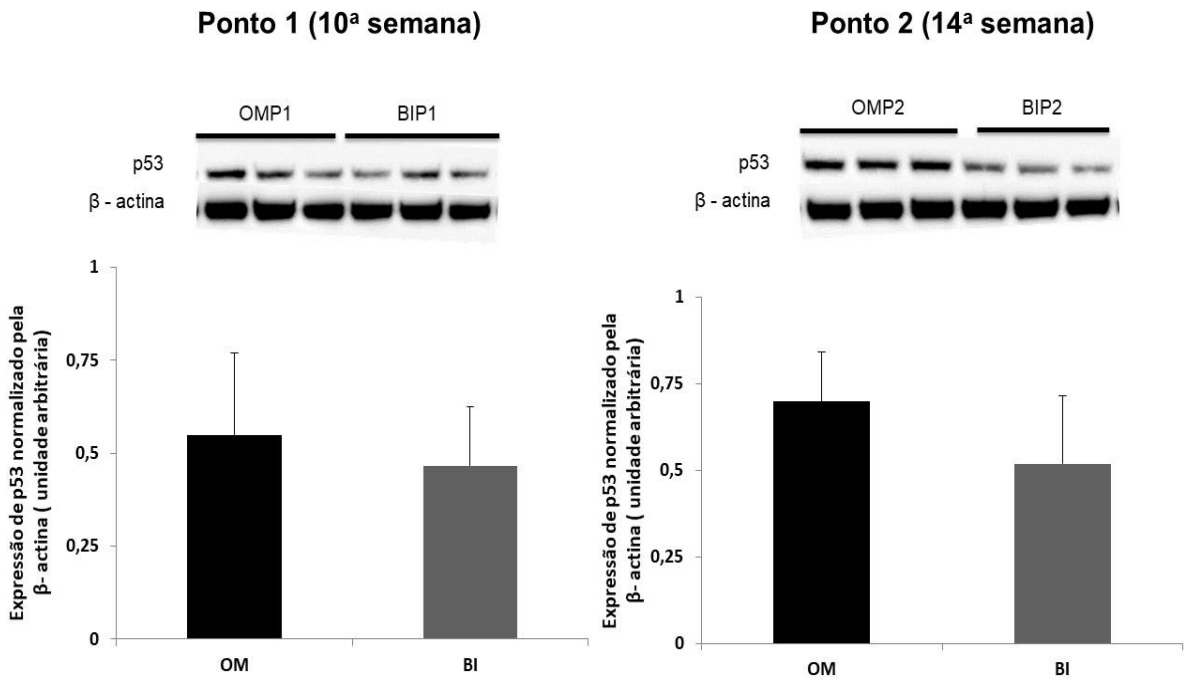


Figura 15: Imagens representativas de *western blot* e densitometria de p53 e β-actina do fígado dos animais submetidos à modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM; n= 4-5.

5.16.3 Quantificação da NFκB (p65)

Não foi observada diferença (p≥0,05) na concentração da proteína NFκB (p65) entre os grupos BIP1 e OMP1. De maneira semelhante não se observou diferença do ponto de vista estatístico (p≥0,05) entre os grupos BIP2 e OMP2 quanto à concentração desta proteína (**Figura 16**).

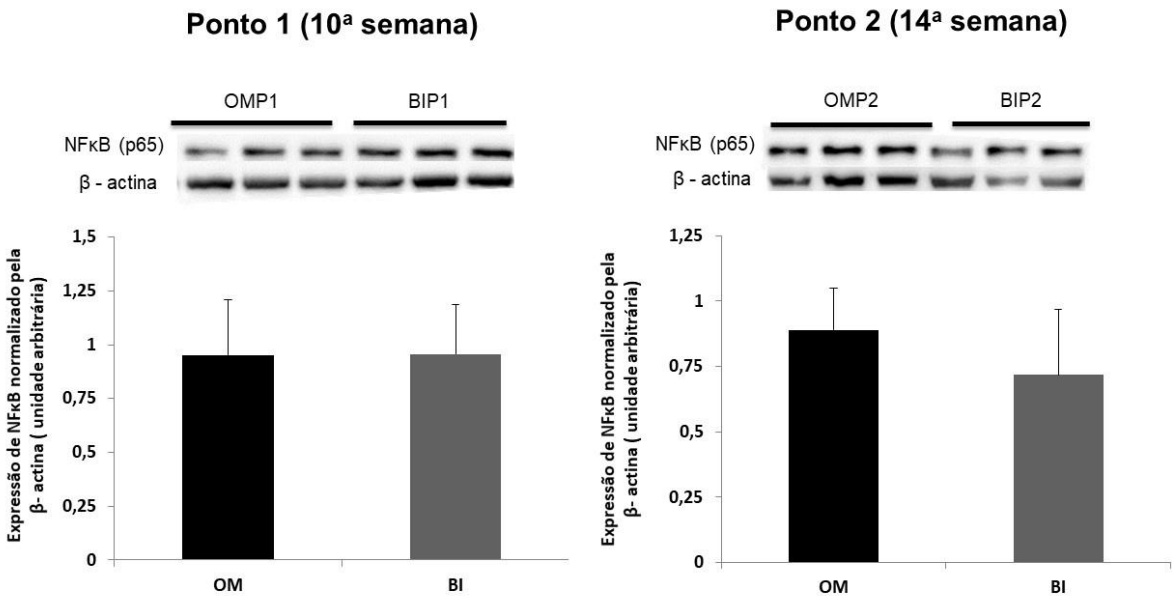


Figura 16: Imagens representativas de *western blot* e densitometria de NFκB e β-actina do fígado dos animais submetidos à modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM; n=4-5.

5.16.4 Quantificação de ERK (Total e fosoforilada)

Em relação as concentrações das proteínas ERK total e pERK e da razão pERK/ERK não foi observada diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os grupos OMP1 e BIP1. Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre as concentrações da proteína pERK e a razão pERK/ERK entre os grupos OMP2 e BIP2 No entanto a ERK total apresentou menores concentrações desta proteína no grupo BIP2 comparada ao grupo OMP2, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significante ($p=0,056$) (**Figura 17**).

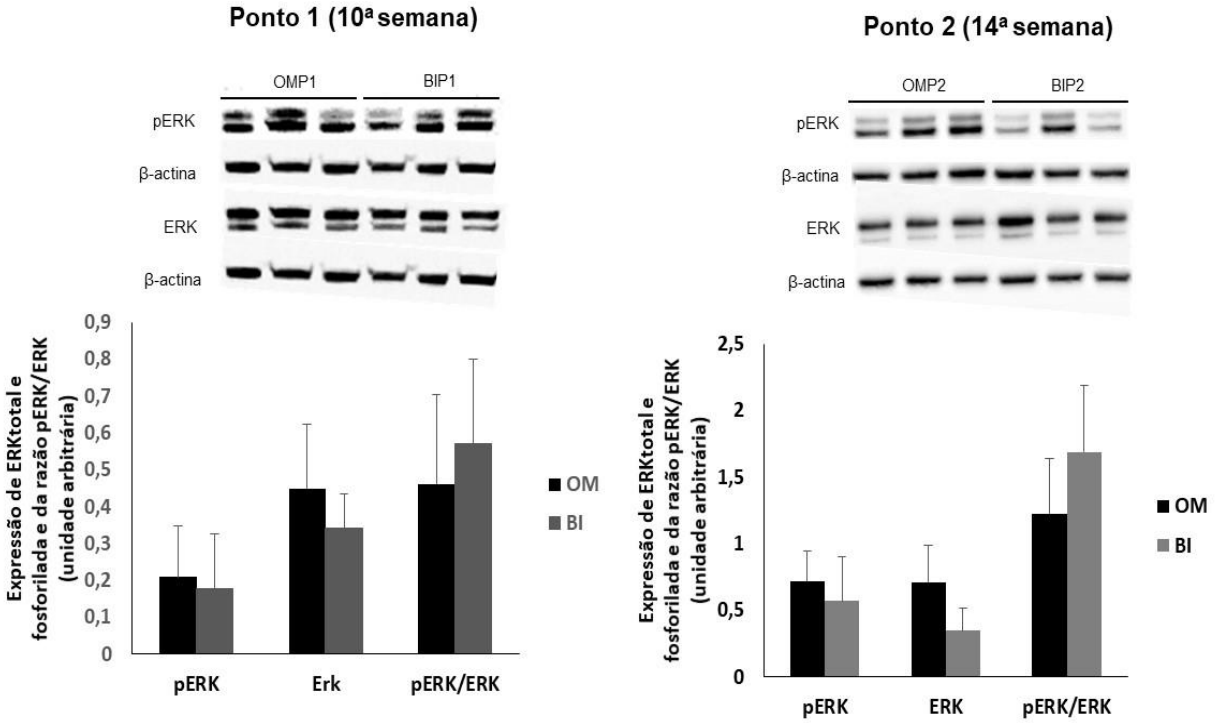


Figura 17: Imagens representativas de *western blot* e densitometria de ERK, pERK, da razão pERK/ERK e β-actina do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM; n=4-5.

5.16.5 Quantificação de PTEN (Total e fosoforilada)

Em relação a PTEN total, pPTEN e a razão pPTEN/PTEN não se observou diferença ($p \geq 0,05$) entre os grupos OMP1 e BIP1, e entre os grupos OMP2 e BIP2 (**Figura 18**).

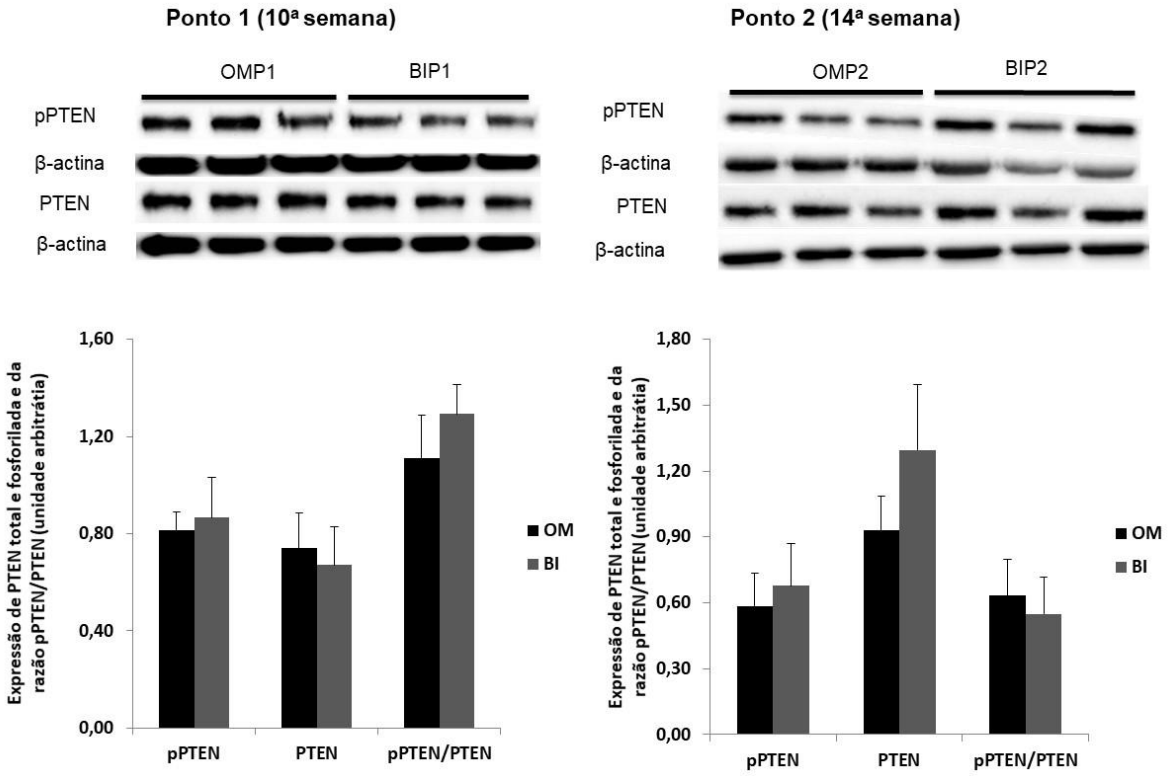


Figura 18: Imagens representativas de *western blot* e densitometria de PTEN, pPTEN, da razão pPTEN/PTEN e β-actina do fígados dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) nas 10ª (P1) e 14ª (P2) semanas. Dados expressos como média ± EPM; n=4-5.

5.16.6 Quantificação de AKT (Total e fosoforilada)

Não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) em relação a expressão a nível proteico de AKT total, pAKT e a razão pAKT/AKT entre os grupos BIP1 e OMP1. De maneira semelhante não se observou diferença do ponto de vista estatístico ($p \geq 0,05$) entre os grupos BIP2 e OMP2 quanto à AKT total, pAKT e a razão pAKT/AKT (**Figura 19**).

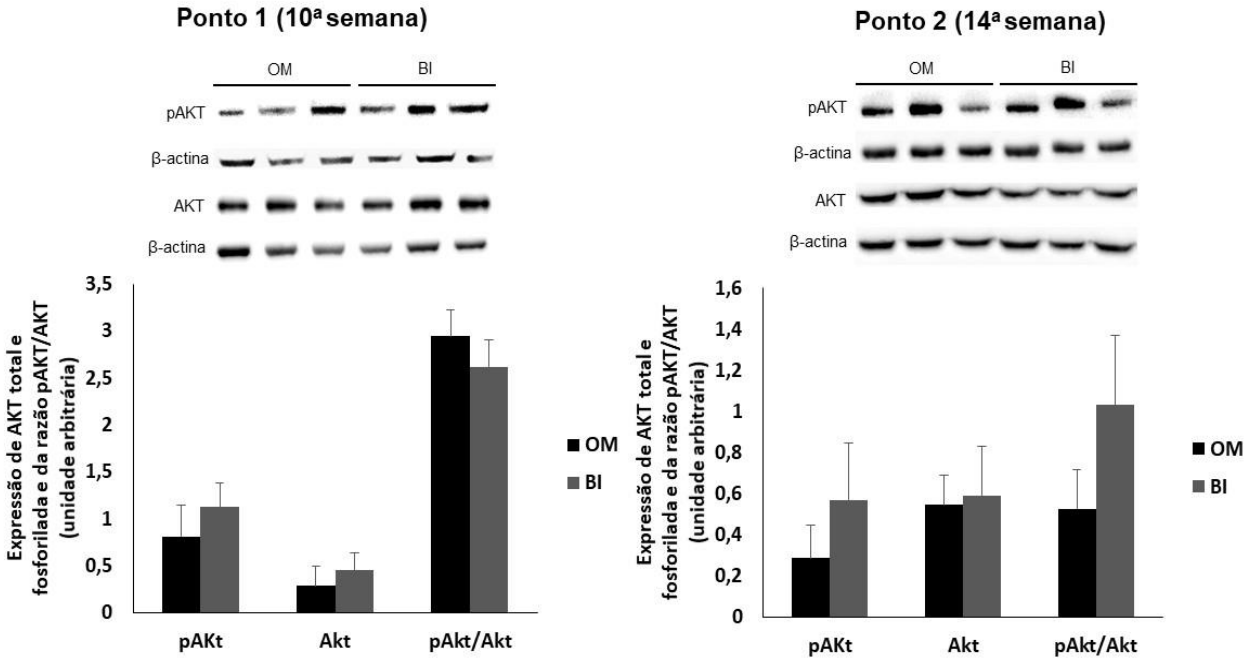


Figura 19: Imagens representativas de **western blot** e densitometria de AKT, pAKT, da razão pAKT/AKT e β-actina do fígado dos animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese tratados com óleo de milho (OM) ou β-ionona (BI) na 10ª (P1) e 14ª (P2) semana. Dados expressos como média ± EPM; n=4-5.

6. Discussão

Doenças hepáticas crônicas são responsáveis por cerca de 2 milhões de mortes por ano no mundo. Essas doenças, de modo geral, apresentam fibrose hepática considerada um dos principais fatores de riscos para o HCC (O'rourke *et al.*, 2018, Asrani *et al.*, 2019). Na literatura, diversos CBAs, como o resveratrol, ômega 3, epigalocatequina galato e cafeína (Furtado *et al.*, 2014; Weiskirchen, 2015; Romualdo *et al.*, 2019), demonstraram atuar no desenvolvimento do processo fibrótico/cirrótico. No entanto, até o presente não foram identificados estudos que avaliaram o efeito de isoprenóides na fibrose, e na hepatocarcinogênese a ela associada.

No presente trabalho utilizou-se o modelo de hepatocarcinogênese experimental em ratos adaptado de Schiffer e colaboradores (2005). O protocolo aqui proposto compreendia inicialmente um total de 24 semanas e 18 doses do carcinógeno (DEN). Entretanto, após a administração da 14ª dose observou-se grande mortalidade nos animais do grupo OMP3 (n=6). Assim, optou-se por interromper a administração da DEN na 16ª semana e adiantar a eutanásia dos animais para a 18ª semana, após um período de *washout* de 2 semanas.

Neste estudo observou-se incidência de 100% de nódulos macroscópicos no fígado dos animais dos grupos OM e BI, nos pontos 2 e 3. O número total de nódulos foi menor no grupo BI no ponto 2, sugerindo um efeito protetor do isoprenóide nesta fase do processo. No entanto, este efeito não foi observado no ponto 3, em que a hepatocarcinogênese está mais avançada (fase neoplásica).

As células neoplásicas consomem, de modo geral, maior quantidade de glicose quando comparadas às células normais de tecidos adjacentes. O análogo da glicose, 18F-FDG, é um indicador da utilização de glicose nas células que permite o diagnóstico de lesões neoplásicas com grande especificidade (Park *et al.*, 2015). Aqui, não foram observadas diferenças em relação ao número de neoplasias identificadas pelo imageamento por 18F-FDG entre os grupos OM e BI no ponto 3, o que está de acordo com a análise de nódulos macroscópicos.

Na microscopia, a BI demonstrou atividade quimiopreventiva ao reduzir as LPNs nos pontos 1 e 2. Esses dados corroboram estudos prévios do grupo em que o tratamento com BI reduziu o número e o tamanho de LPNs nas fases de iniciação/promoção (De Moura Espíndola *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2019) e de seleção/promoção da

hepatocarcinogênese (Cardozo *et al.*, 2011). Deste modo, esse isoprenóide demonstrou atividade quimiopreventiva mesmo em um contexto de fibrose em fases precoces da carcinogênese hepática (ponto 1 e 2). No entanto, não foi observada alteração em relação ao número ou tamanho das LPNs em fase mais avançada da hepatocarcinogênese (ponto 3). Este dado está de acordo com a análise de incidência de neoplasias na qual não houve diferenças entre os grupos OMP3 e BIP3. Ainda que não tenha sido possível determinar por meio deste estudo, o efeito protetor da BI em relação a incidência de neoplasias, foi possível verificar que o isoprenóide aumentou a incidência de HCC *low* e diminuiu a de HCC *high*. Isto sugere que esse CBA tenha inibido células tumorais mais agressivas, atenuando o desenvolvimento do HCC. Além disso, no ponto 3 observou-se menor mortalidade dos animais do grupo BIP3, sugerindo um efeito protetor deste isoprenóide. Assim, análises de marcadores de mau prognóstico poderiam elucidar o efeito da BI em etapa mais avançada da hepatocarcinogênese.

Neste trabalho, a BI reduziu a proliferação celular no grupo BIP2 em relação a controle OMP2. Alguns dos possíveis alvos da BI na inibição da proliferação poderiam envolver as vias da PI3K/AKT e MAPK/ERK. Essas estão relacionadas com o crescimento e proliferação celular e se encontram desreguladas no HCC (Burotto *et al.*, 2014; Terracciano *et al.*, 2019). No estudo de Liu e colaboradores (2012), a BI reduziu os níveis de pAKT em células SGC-7901 de adenocarcinoma gástrico (Liu *et al.*, 2013). Contudo, não foi observado no presente tabalho modulação desta proteína pela BI. Além disso, não foram observadas alterações quanto às concentrações das proteínas PTEN (regulador negativo de AKT) e ERK, sugerindo que a modulação da proliferação celular aqui observada ocorra por outros mecanismos que não pela modulação destas proteínas.

Assim, procurou-se avaliar a proteína p21 que atua na transição da fase G1 para S no ciclo celular (Galanos *et al.*, 2016) inibindo sua progressão e diminuindo o crescimento (Zhang *et al.*, 2009). No presente estudo, a BI reduziu as concentrações hepáticas de proteína p21 dos animais eutanasiados no ponto 1 e aumentou as concentrações desta proteína no fígado dos animais no ponto 2. É possível que os diferentes efeitos da BI observados em relação a proteína, sejam consequência da etapa da hepatocarcinogênese na qual esses animais se encontravam.

Em modelos de HCC induzido por DEN ocorre o dano no DNA, a liberação de ROS e a morte de hepatócitos (Shang *et al.*, 2018). Na tentativa de reparar os danos e repor os hepatócitos perdidos, ocorre a ativação da proliferação celular de células envolvidas na cicatrização (miofibroblastos), bem como de células ovais que podem se

diferenciar em novas células hepáticas atuando na regeneração do órgão (Xiang *et al.*, 2012). Nesse sentido a inibição da p21 no ponto 1, poderia estar correlacionada ao aumento da proliferação celular na tentativa de reestabelecer a homeostase do fígado.

No ponto 2, porém, o processo fibrótico já estava bem estabelecido e a carcinogênese mais avançada. Segundo estudo de Park e colaboradores (2009), a administração de DEN em ratos *Wistar* 2x/semana durante por 12 semanas resultou em maiores concentrações de p21. O estudo também demonstrou que a maior concentração de p21 se manteve mesmo após 10 semanas de interrupção da DEN e estava relacionada à progressão neoplásica (Park *et al.*, 2009). Deste modo, a inibição de p21 pela BI no ponto 2 representaria um efeito protetor da hepatocarcinogênese nestes animais. Porém, outras proteínas estão envolvidas na progressão do ciclo celular, como as ciclinas (A, B, D e E), ciclinas dependentes de quinase (CDKs), além de reguladoras do ciclo como as proteínas p53, p27 e p16 (Otto e Sicinski, 2017). No presente estudo, quando avaliou-se a concentração da p53, este isoprenóide não alterou os níveis da mesma em extratos de proteína total. No entanto, sabe-se que a p53 se acumula no núcleo, onde pode regular os seus alvos de transcrição para induzir eventos como apoptose e parada do ciclo celular (Meng *et al.*, 2014; Galanos *et al.*, 2016). Assim, outras análises, como a avaliação da p53 nuclear, poderiam determinar a ação deste isoprenóide na proliferação celular.

A BI apresenta ainda a capacidade de induzir a apoptose em modelos *in vitro*. No entanto, estudos prévios do grupo esse isoprenóide não atuou na apoptose em modelos *in vivo* (Cardozo *et al.*, 2011; Scolastici *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2019). No presente estudo, não houve diferença no índice apoptótico do grupo BI em relação ao grupo OM nas LPNs em nenhum dos pontos avaliados (pontos 1 e 2), corroborando dados da literatura.

O protocolo aqui utilizado possibilitou a observação do processo fibrótico em diversos graus e, de maneira inédita na literatura, demonstrou que a BI inibe o desenvolvimento da fibrose hepática em diferentes estágios da hepatocarcinogênese (pontos 1, 2 e 3). Na injúria hepática ocorre ativação das CHE resultando na transdiferenciação destas em miofibroblastos (Zhou *et al.*, 2014), que têm papel fundamental na resposta ao dano e caracterizam-se pela expressão diferenciada de proteínas da MEC como colágeno e α-SMA (He *et al.*, 2015). Assim, a ação inibitória da BI no desenvolvimento da fibrose pode estar relacionada à sua capacidade de reduzir a concentração hepática de colágeno, evidenciadas neste estudo pela redução da porcentagem de área marcada por picrosirus (pontos 1, 2) bem como pela diminuição das

concentrações de hidroxiprolina (P2). No estudo de Wu e colaboradores (2010) camundongos induzidos à fibrose por tioacetamida e tratados com extrato de *Ganoderma lucidum* por quatro semanas também apresentaram reduzidas concentrações hepáticas de hidroxiprolina e de colágeno (Wu et al., 2010). Essas alterações podem ser decorrentes de um efeito inibitório na ativação das CHE e, consequentemente, na deposição de componentes de MEC. Além disso, a BI reduziu a porcentagem de área positiva para α-SMA, sugerindo outro possível mecanismo de ação do isoprenóide no desenvolvimento desta afecção.

As MMPs são proteínas envolvidas na degradação dos componentes da MEC levando à restituição do parênquima hepático após o dano (Duarte *et al.*, 2015). As MMP2 e MMP9 são gelatinases que utilizam como substrato o colágeno desnaturado (gelatina), além de colágeno dos tipos IV, V e VII (Tsukada *et al.*, 2006). No processo fibrótico a MMP-2 está constantemente expressa em miofibroblastos e parece desempenhar um papel profibrogênico (Iimuro e Brenner, 2008). A MMP-9 está associada à redução da atividade inflamatória em doenças hepáticas crônicas, além de participar da ativação das CHE (Hemmann *et al.*, 2007), da progressão tumoral, invasão, metástase e angiogênese (Roeb, 2018). Nesse sentido, a redução dessas MMPs poderia representar um possível alvo na prevenção da fibrose e, consequentemente, da carcinogênese hepática.

O estudo de Huang e colaboradores (2012) demonstrou que o tratamento com BI resultou na redução da atividade das MMP-2 e MMP-9 em células SK-Hep-1 de hepatocarcinoma metastático humano (Huang *et al.*, 2012). No entanto, no presente trabalho a BI foi capaz de reduzir apenas as subunidades MMP-9 ativa no P1 e a pro-MMP-2 no P2, não sendo observada, portanto, uma clara modulação durante a progressão da fibrose. Assim, embora a BI tenha modulado a ativação de subunidades de MMP-2 e MMP-9, são necessárias análises complementares, como a avaliação da atividade das colagenases, para definir o papel deste isoprenóide nas endopeptidades em diferentes etapas da fibrose hepática.

Outro mecanismo que poderia explicar o efeito da BI na fibrose seria sua capacidade de modular o processo inflamatório. Em estudo prévio do grupo a BI reduziu o número de focos inflamatórios quando administrada em ratos *Wistar* submetidos ao modelo do RH associado a DHGNA (Miranda *et al.*, 2019). Além disso, esse isoprenóide reduziu as concentrações da proteína p65, uma das proteínas que compõe o fator de transcrição NFκB, em pLPN de ratos *Wistar* submetidos ao modelo do RH (Scolastici *et al.*, 2014). No entanto, aqui não observou-se modulação da proteína p65 pela BI nas

etapas avaliadas (pontos 1 e 2). Essa divergência poderia ser explicada pelas diferentes doses de DEN administradas.

No trabalho de Scolastici e colaboradores apenas uma dose de DEN foi utilizada na indução da carcinogênese (Scolastici *et al.*, 2014), no entanto, no presente estudo a administração do carcinógeno foi crônica, o que resultou em maior dano hepático e, possivelmente, em um microambiente mais inflamatório. Isto sugere que o efeito da BI na modulação da p65 seja observado em microambientes de menor dano hepático e inflamação. Assim, a ação da BI no processo fibrótico pode estar relacionado a outros mecanismos que não pela modulação da p65.

O dano hepático promove ainda a ativação de células do sistema imunológico como as células de Kupffer (macrófagos) que podem atuar na inflamação, na promoção e manutenção do processo fibrótico, bem como na degradação do colágeno na fase de resolução (Li, H. *et al.*, 2016). Além disso, seu fenótipo, é altamente influenciado pelos sinais do microambiente (Beljaars *et al.*, 2014). A ativação dos macrófagos inclui as vias clássica e alternativa, que irão gerar macrófagos dos tipos M1 e M2, respectivamente, que são positivos para CD68 (Li, H. *et al.*, 2016). No presente trabalho a BI reduziu o número de células positivas para CD68 no ponto 1, no entanto, no ponto 2 esse marcador não se mostrou diferente entre os grupos OM e BI. Deste modo, sugere-se que a BI possa atuar inibindo a ativação de macrófagos na fase inicial do processo fibrótico. Porém, para confirmar essa hipótese é necessária uma avaliação mais profunda do processo inflamatório hepático visando esclarecer mecanismos envolvidos na progressão da fibrose.

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que a BI apresenta efeito inibitório no desenvolvimento da fibrose hepática, atuando principalmente na redução das concentrações de colágeno e α-SMA no fígado. Além disso, mesmo em modelo de hepatocarcinogênese associado à fibrose esse isoprenóide demonstrou efeito quimiopreventivo nas etapas iniciais da carcinogênese hepática, atuando no número e tamanho de LPNs e inibindo a proliferação celular. A BI parece também selecionar as células neoplásicas por reduzir a incidência de HCC *high*, sugerindo que este CBA possa atuar na agressividade tumoral. Contudo, são necessárias análises complementares que elucidem mecanismos pelos quais o isoprenóide atua na hepatocarcinogênese associada à fibrose.

8.Referências

1. AFFO, S.; YU, L. X.; SCHWABE, R. F. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. **Annu Rev Pathol,** v. 12, p. 153-186, 01 2017. ISSN 1553-4014.

2. AGRAWAL, S. et al. Management of Hepatocellular Adenoma: Recent Advances. **Clin Gastroenterol Hepatol,** v. 13, n. 7, p. 1221-30, Jul 2015. ISSN 1542-7714.

3. ANDERSEN, J. B. et al. Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat. **Hepatology,** v. 51, n. 4, p. 1401-9, Apr 2010. ISSN 1527-3350.

4. ANDRADE, F. O. et al. Antiangiogenic effects of the chemopreventive agent tributyrin, a butyric acid prodrug, during the promotion phase of hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, Dec 2018. ISSN 1460-2180.

5. ANSARI, M.; EMAMI, S. β-Ionone and its analogs as promising anticancer agents. **Eur J Med Chem,** v. 123, p. 141-154, Nov 2016. ISSN 1768-3254.

6. ASRANI, S. K. et al. Burden of liver diseases in the world. **J Hepatol,** v. 70, n. 1, p. 151-171, Jan 2019. ISSN 1600-0641.

7. BAGLIERI, J.; BRENNER, D. A.; KISSELEVA, T. The Role of Fibrosis and Liver-Associated Fibroblasts in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. **Int J Mol Sci,** v. 20, n. 7, Apr 2019. ISSN 1422-0067.

8. BANNASCH, P.; HAERTEL, T.; SU, Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. **Toxicologic Pathology,** v. 31, n. 1, p. 134-139, 2003.

9. BELJAARS, L. et al. Hepatic Localization of Macrophage Phenotypes during Fibrogenesis and Resolution of Fibrosis in Mice and Humans. **Front Immunol,** v. 5, p. 430, 2014. ISSN 1664-3224.

10. BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol Aspects Med,** v. 21, n. 6, p. 167-223, Dec 2000. ISSN 0098-2997.

11. BLECHACZ, B. Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. **Gut Liver,** v. 11, n. 1, p. 13-26, Jan 2017. ISSN 2005-1212.

12. BOCCI, G.; LOUPAKIS, F. The possible role of chemotherapy in antiangiogenic drug resistance. **Med Hypotheses,** v. 78, n. 5, p. 646-8, May 2012. ISSN 1532-2777.

13. BLONSKI, W.; KOTLYAR, D. S.; FORDE, K. A. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol,** v. 16, n. 29, p. 3603-15, Aug 2010. ISSN 2219-2840.

14. BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin,** v. 68, n. 6, p. 394-424, 11 2018. ISSN 1542-4863.

15. BRUCK, R. et al. Induced hypothyroidism accelerates the regression of liver fibrosis in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology,** v. 22, n. 12, p. 2189-2194, 2007.

16. BUROTTO, M. et al. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. **Cancer,** v. 120, n. 22, p. 3446-56, Nov 2014. ISSN 1097-0142.

17. BÖTTCHER, K.; PINZANI, M. Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents. **Adv Drug Deliv Rev,** v. 121, p. 3-8, 11 2017. ISSN 1872-8294.

18. CAMPANA, L.; IREDALE, J. P. Regression of Liver Fibrosis. **Semin Liver Dis,** v. 37, n. 1, p. 1-10, 02 2017. ISSN 1098-8971.

19. CARDOZO, M. T. et al. Chemopreventive effects of β-ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. **J Nutr Biochem,** v. 22, n. 2, p. 130-5, Feb 2011. ISSN 1873-4847..

20. CHAN, A. W. H.; BURT, A. D. **Liver cell dysplasia and early hepatocellular carcinoma**. Diagnostic Histopathology, v12, n.12, p. 512-520, 2011. ISSN 1756-2317.

21. CHEN, C. J.; LEE, M. H. Early diagnosis of hepatocellular carcinoma by multiple microRNAs: validity, efficacy, and cost-effectiveness. **J Clin Oncol,** v. 29, n. 36, p. 4745-7, Dec 2011. ISSN 1527-7755.

22. CHEN, G. G. et al. Mutation of p53 in recurrent hepatocellular carcinoma and its association with the expression of ZBP-89. **Am J Pathol,** v. 162, n. 6, p. 1823-9, Jun 2003. ISSN 0002-9440.

23. CHEN, Z. et al. Cullin family proteins and tumorigenesis: genetic association and molecular mechanisms. **J Cancer,** v. 6, n. 3, p. 233-42, 2015. ISSN 1837-9664.

24. DAGLI, M. L. Z. et al. Beta-carotene reduces the ductular (oval) cell reaction in the liver of Wistar rats submitted to the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. **Pathology,** v. 30, n. 3, p. 259-264, 1998.

25. DE MINICIS, S. et al. Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. **Dig Liver Dis,** v. 45, n. 6, p. 450-9, Jun 2013. ISSN 1878-3562.

26. DE MOURA ESPÍNDOLA, R. et al. Geranylgeraniol and beta-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-kappaB activation. **Carcinogenesis,** v. 26, n. 6, p. 1091-9, Jun 2005. ISSN 0143-3334..

27. DUARTE, S. et al. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. **Matrix Biol,** v. 44-46, p. 147-56, 2015 May-Jul 2015.

28. ESNAOLA, N. F. et al. Evaluation and management of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. **Cancer,** v. 122, n. 9, p. 1349-69, May 2016. ISSN 1097-0142..

29. ESPOSITO, I.; SCHIRMACHER, P. Pathological aspects of cholangiocarcinoma. **HPB (Oxford),** v. 10, n. 2, p. 83-6, 2008. ISSN 1365-182X..

30. FARBER, E. Clonal adaptation during carcinogenesis. **Biochem Pharmacol,** v. 39, n. 12, p. 1837-46, Jun 1990. ISSN 0006-2952.

31. FARBER, E.; SARMA, D. S. R. Biology of disease. Hepatocarcinogenesis: A dynamic cellular perspective. **Laboratory Investigation,** v. 56, n. 1, p. 4-22, 1987.

32. FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer,** v. 4, n. 2, p. 143-53, 02 2004. ISSN 1474-175X.

33. FEO, F.; FRAU, M.; PASCALE, R. M. Interaction of major genes predisposing to hepatocellular carcinoma with genes encoding signal transduction pathways influences tumor phenotype and prognosis. **World Journal of Gastroenterology,** v. 14, n. 43, p. 6601-6615, 2008.

34. FISHER, R.; PUSZTAI, L.; SWANTON, C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. **Br J Cancer,** v. 108, n. 3, p. 479-85, Feb 2013. ISSN 1532-1827.

35. FURTADO, K. S. et al. β-ionone modulates the expression of miRNAs and genes involved in the metastatic phenotype of microdissected persistent preneoplastic lesions in rats submitted to hepatocarcinogenesis. **Mol Carcinog,** v. 56, n. 1, p. 184-196, Jan 2017. ISSN 1098-2744.

36. FURTADO, K. S. et al. Prevention of rat liver fibrosis and carcinogenesis by coffee and caffeine. **Food Chem Toxicol,** v. 64, p. 20-6, Feb 2014..

37. GAFFNEY, J. et al. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. **Matrix Biol,** v. 44-46, p. 191-9, 2015 May-Jul 2015. ISSN 1569-1802.

38. GALANOS, P. et al. Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. **Nat Cell Biol,** v. 18, n. 7, p. 777-89, Jul 2016. ISSN 1476-4679.

39. GANG, Z. et al. Measuring microenvironment mechanical stress of rat liver during diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis by atomic force microscope. **Microsc Res Tech,** v. 72, n. 9, p. 672-8, Sep 2009. ISSN 1097-0029.

40. GOVAERE, O.; ROSKAMS, T. Pathogenesis and prognosis of hepatocellular carcinoma at the cellular and molecular levels. **Clin Liver Dis,** v. 19, n. 2, p. 261-76, May 2015. ISSN 1557-8224.

41. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell,** v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

42. HE, Y. et al. Mechanisms of fibrosis in acute liver failure. **Liver Int,** v. 35, n. 7, p. 1877-85, Jul 2015. ISSN 1478-3231..

43. HEMMANN, S. et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. **J Hepatol,** v. 46, n. 5, p. 955-75, May 2007. ISSN 0168-8278.

44. HERNANDEZ-GEA, V. et al. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology,** v. 144, n. 3, p. 512-27, Mar 2013. ISSN 1528-0012.

45. HIGASHI, K. et al. Regulatory mechanism of glutathione S-transferase P-form during chemical hepatocarcinogenesis: old wine in a new bottle. **Cancer Letters,** v. 209, n. 2, p. 155-163, 2004. ISSN 0304-3835.

46. HIGASHI, T.; FRIEDMAN, S. L.; HOSHIDA, Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. **Adv Drug Deliv Rev,** v. 121, p. 27-42, 11 2017. ISSN 1872-8294.

47. HUANG, C. S. et al. The anti-metastatic efficacy of β-ionone and the possible mechanisms of action in human hepatocarcinoma SK-Hep-1 cells. **Br J Nutr,** v. 107, n. 5, p. 631-8, Mar 2012. ISSN 1475-2662.

48. IIMURO, Y.; BRENNER, D. A. Matrix metalloproteinase gene delivery for liver fibrosis. **Pharm Res,** v. 25, n. 2, p. 249-58, Feb 2008. ISSN 0724-8741.

49. ITOH, Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. **Matrix Biol,** v. 44-46, p. 207-23, 2015 May-Jul 2015. ISSN 1569-1802.

50. KANG, C. H. et al. β-Ionone attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators such as NO, PGE2 and TNF-α in BV2 microglial cells via suppression of the NF-κB and MAPK pathway. **Toxicol In Vitro,** v. 27, n. 2, p. 782-7, Mar 2013. ISSN 1879-3177.

51. KANG, J. S. et al. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. **Cancer Res,** v. 67, n. 23, p. 11141-6, Dec 2007. ISSN 1538-7445. D.

52. KIRSTEIN, M. M.; VOGEL, A. Epidemiology and Risk Factors of Cholangiocarcinoma. **Visc Med,** v. 32, n. 6, p. 395-400, Dec 2016. ISSN 2297-4725.

53. KULIK, L.; EL-SERAG, H. B. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology,** v. 156, n. 2, p. 477-491.e1, 01 2019. ISSN 1528-0012.

54. LARTER, C. Z.; YEH, M. M. Animal models of NASH: Getting both pathology and metabolic context right. **Journal of Gastroenterology and Hepatology,** v. 23, n. 11, p. 1635-1648, 2008.

55. LEVIN, S. Apoptosis, Necrosis, or Oncosis: What Is Your Diagnosis? A Report from the Cell Death Nomenclature Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. **Toxicological Sciences,** v. 41, n. 2, p. 155-156, 1998.

56. LI, H. et al. Hepatic macrophages in liver fibrosis: pathogenesis and potential therapeutic targets. **BMJ Open Gastroenterol,** v. 3, n. 1, p. e000079, 2016. ISSN 2054-4774.

57. LI, L. et al. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. **Oncol Lett,** v. 12, n. 5, p. 3045-3050, Nov 2016. ISSN 1792-1074.

58. LIAO, Q. et al. Potential Role of Circulating microRNA-21 for Hepatocellular Carcinoma Diagnosis: A Meta-Analysis. **PLoS One,** v. 10, n. 6, p. e0130677, 2015. ISSN 1932-6203.

59. LIBBRECHT, L.; DESMET, V.; ROSKAMS, T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. **Liver Int,** v. 25, n. 1, p. 16-27, Feb 2005. ISSN 1478-3223.

60. LIU, J. R. et al. Effects of beta-ionone on mammary carcinogenesis and antioxidant status in rats treated with DMBA. **Nutr Cancer,** v. 62, n. 1, p. 58-65, 2010. ISSN 1532-7914.

61. LIU, M.; JIANG, L.; GUAN, X. Y. The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. **Protein Cell,** v. 5, n. 9, p. 673-91, Sep 2014. ISSN 1674-8018.

62. LIU, Q. et al. Apoptosis initiation of β-ionone in SGC-7901 gastric carcinoma cancer cells via a PI3K-AKT pathway. **Archives of Toxicology,** v. 87, n. 3, p. 481-490, 2013. ISSN 0340-5761.

63. LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Dis Primers,** v. 2, p. 16018, 04 2016. ISSN 2056-676X.

64. LOEB, L. A.; LOEB, K. R.; ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 100, n. 3, p. 776-81, Feb 2003. ISSN 0027-8424.

65. LU, Y. M.; CHENG, F.; TENG, L. S. The association between phosphatase and tensin homolog hypermethylation and patients with breast cancer, a meta-analysis and literature review. **Sci Rep,** v. 6, p. 32723, 09 2016. ISSN 2045-2322.

66. LUCH, A. Nature and nurture - Lessons from chemical carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer,** v. 5, n. 2, p. 113-125, 2005.

67. LUEDDE, T.; SCHWABE, R. F. NF-κB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol,** v. 8, n. 2, p. 108-18, Feb 2011. ISSN 1759-5053.

68. MAEDA, S. NF-κB, JNK, and TLR Signaling Pathways in Hepatocarcinogenesis. **Gastroenterol Res Pract,** v. 2010, p. 367694, 2010. ISSN 1687-630X.

69. MARGOLSKEE, E. et al. Hepatocellular adenoma classification: a comparative evaluation of immunohistochemistry and targeted mutational analysis. **Diagn Pathol,** v. 11, p. 27, Mar 2016. ISSN 1746-1596. D

70. MARQUARDT, J. U.; THORGEIRSSON, S. S. Stem cells in hepatocarcinogenesis: Evidence from genomic data. **Seminars in Liver Disease,** v. 30, n. 1, p. 26-34, 2010.

71. MATTER, M. S. et al. Targeting the mTOR pathway in hepatocellular carcinoma: current state and future trends. **J Hepatol,** v. 60, n. 4, p. 855-65, Apr 2014. ISSN 1600-0641.

72. MAZZANTI, R.; ARENA, U.; TASSI, R. Hepatocellular carcinoma: Where are we? **World J Exp Med,** v. 6, n. 1, p. 21-36, Feb 2016. ISSN 2220-315X.

73. MEMMOTT, R. M.; DENNIS, P. A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. **Cell Signal,** v. 21, n. 5, p. 656-64, May 2009. ISSN 1873-3913.

74. MENG, X. et al. MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res,** v. 74, n. 24, p. 7161-7, Dec 2014. ISSN 1538-7445.

75. MIRANDA, M. L. P. et al. β-ionone inhibits nonalcoholic fatty liver disease and its association with hepatocarcinogenesis in male Wistar rats. **Chem Biol Interact,** v. 308, p. 377-384, May 2019.

76. MISHRA, L. et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. **Hepatology,** v. 49, n. 1, p. 318-29, Jan 2009. ISSN 1527-3350.

77. MO, H.; ELSON, C. E. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. **Experimental Biology and Medicine,** v. 229, n. 7, p. 567-585, 2004.

78. MORENO, F. S.; HEIDOR, R.; POGRIBNY, I. P. Nutritional Epigenetics and the Prevention of Hepatocellular Carcinoma with Bioactive Food Constituents. **Nutr Cancer,** v. 68, n. 5, p. 719-33, Jul 2016. ISSN 1532-7914.

79. MORENO, F. S. et al. Effect of β-carotene on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. **Cancer Letters,** v. 96, n. 2, p. 201-208, 1995.

80. NAKANUMA, Y.; KAKUDA, Y. Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. **Best Pract Res Clin Gastroenterol,** v. 29, n. 2, p. 277-93, Apr 2015. ISSN 1532-1916.

81. NGUYEN, L. V. et al. Cancer stem cells: an evolving concept. **Nat Rev Cancer,** v. 12, n. 2, p. 133-43, 01 2012. ISSN 1474-1768.

82. NISHIDA, N.; GOEL, A. Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review. **Curr Genomics,** v. 12, n. 2, p. 130-7, Apr 2011. ISSN 1875-5488.

83. NIU, Z. S.; NIU, X. J.; WANG, W. H. Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. **World J Gastroenterol,** v. 22, n. 41, p. 9069-9095, Nov 2016. ISSN 2219-2840.

84. O'ROURKE, J. M. et al. Carcinogenesis on the background of liver fibrosis: Implications for the management of hepatocellular cancer. **World J Gastroenterol,** v. 24, n. 39, p. 4436-4447, Oct 2018. ISSN 2219-2840.

85. ODOUX, C. et al. A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer. **Cancer Res,** v. 68, n. 17, p. 6932-41, Sep 2008. ISSN 1538-7445.

86. OISHI, N.; WANG, X. W. Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells. **Int J Biol Sci,** v. 7, n. 5, p. 517-35, Apr 2011. ISSN 1449-2288.

87. ONG, T. P. et al. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell

proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. **Carcinogenesis,** v. 27, n. 6, p. 1194-1203, 2006..

88. OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nat Rev Cancer,** v. 17, n. 2, p. 93-115, 01 2017. ISSN 1474-1768.

89. PARK, D. H. et al. Diethylnitrosamine (DEN) induces irreversible hepatocellular carcinogenesis through overexpression of G1/S-phase regulatory proteins in rat. **Toxicol Lett,** v. 191, n. 2-3, p. 321-6, Dec 2009. ISSN 1879-3169.

90. PARK, S. I. et al. Evaluation of 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography/computed tomography in rat models with hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis. **Biomed Mater Eng,** v. 26 Suppl 1, p. S1669-76, 2015. ISSN 1878-3619.

91. PARK, Y. N.; RONCALLI, M. Large liver cell dysplasia: a controversial entity. **J Hepatol,** v. 45, n. 5, p. 734-43, Nov 2006. ISSN 0168-8278.

92. PATEL, D.; SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). **Int J Oncol,** v. 30, n. 1, p. 233-45, Jan 2007. ISSN 1019-6439.

93. PATEL, T. Cholangiocarcinoma--controversies and challenges. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol,** v. 8, n. 4, p. 189-200, Apr 2011. ISSN 1759-5053.

94. PELLICORO, A. et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nat Rev Immunol,** v. 14, n. 3, p. 181-94, Mar 2014. ISSN 1474-1741.

95. PITOT, H. C. Animal models of neoplastic development. **Dev Biol (Basel),** v. 106, p. 53-7; discussion 57-9, 143-60, 2001. ISSN 1424-6074.

96. PITOT, H. C. Adventures in hepatocarcinogenesis. **Annu Rev Pathol,** v. 2, p. 1-29, 2007. ISSN 1553-4006.

97. RAZA, A.; SOOD, G. K. Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine. **World J Gastroenterol,** v. 20, n. 15, p. 4115-27, Apr 2014. ISSN 2219-2840.

98. RODERFELD, M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. **Matrix Biol,** v. 68-69, p. 452-462, 08 2018. ISSN 1569-1802.

99. ROEB, E. Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects). **Matrix Biol,** v. 68-69, p. 463-473, 08 2018. ISSN 1569-1802.

100. ROMUALDO, G. R. et al. Drinking for protection? Epidemiological and experimental evidence on the beneficial effects of coffee or major coffee compounds against gastrointestinal and liver carcinogenesis. **Food Res Int,** v. 123, p. 567-589, Sep 2019. ISSN 1873-7145.

101. RONCALLI, M.; BORZIO, M.; DI TOMMASO, L. Hepatocellular dysplastic nodules. **Hepatol Res,** v. 37 Suppl 2, p. S125-34, Sep 2007. ISSN 1386-6346.

102. RONCALLI, M.; PARK, Y. N.; DI TOMMASO, L. Histopathological classification of hepatocellular carcinoma. **Dig Liver Dis,** v. 42 Suppl 3, p. S228-34, Jul 2010. ISSN 1878-3562.

103. ROSKAMS, T. Relationships Among Stellate Cell Activation, Progenitor Cells, and Hepatic Regeneration. **Clinics in Liver Disease,** v. 12, n. 4, p. 853-860, 2008.

104. ROSKAMS, T.; KATOONIZADEH, A.; KOMUTA, M. Hepatic progenitor cells: an update. **Clin Liver Dis,** v. 14, n. 4, p. 705-18, Nov 2010. ISSN 1557-8224.

105. ROSS, S. A. Nutritional genomic approaches to cancer prevention research. **Experimental Oncology,** v. 29, n. 4, p. 250-256, 2007.

106. SAMATAR, A. A.; POULIKAKOS, P. I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. **Nat Rev Drug Discov,** v. 13, n. 12, p. 928-42, Dec 2014. ISSN 1474-1784.

107. SCHIFFER, E. et al. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. **Hepatology,** v. 41, n. 2, p. 307-14, Feb 2005. ISSN 0270-9139.

108. SCHLAGETER, M. et al. Histopathology of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol,** v. 20, n. 43, p. 15955-64, Nov 2014. ISSN 2219-2840.

109. SCOLASTICI, C. et al. β-ionone inhibits persistent preneoplastic lesions during the early promotion phase of rat hepatocarcinogenesis: TGF-α, NF-κB, and p53 as cellular targets. **Nutr Cancer,** v. 66, n. 2, p. 234-41, 2014. ISSN 1532-7914.

110. SHAFIZADEH, N.; KAKAR, S. Diagnosis of well-differentiated hepatocellular lesions: role of immunohistochemistry and other ancillary techniques. **Adv Anat Pathol,** v. 18, n. 6, p. 438-45, Nov 2011. ISSN 1533-4031.

111. SHANG, N. et al. Caspase-3 suppresses diethylnitrosamine-induced hepatocyte death, compensatory proliferation and hepatocarcinogenesis through inhibiting p38 activation. **Cell Death Dis,** v. 9, n. 5, p. 558, 05 2018. ISSN 2041-4889.

112. SHUKLA, Y.; KALRA, N. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. **Cancer Letters,** v. 247, n. 2, p. 167-181, 2007.

113. SPORN, M. Anticarcinogenesis studies with vitamin A and its analogs. **Environmental Health Perspectives,** v. Vol.16, p. 185, 1976.

114. SPORN, M. B. et al. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Federation Proceedings,** v. 35, n. 6, p. 1332-1338, 1976.

115. SUN, B.; KARIN, M. Obesity, inflammation, and liver cancer. **Journal of Hepatology,** v. 56, n. 3, p. 704-713, 2012.

116. SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat Rev Cancer,** v. 3, n. 10, p. 768-80, Oct 2003. ISSN 1474-175X.

117. SUZUKI, S. et al. Specific differences in gene expression profile revealed by cDNA microarray analysis of glutathione S-transferase placental form (GST-P) immunohistochemically positive rat liver foci and surrounding tissue. **Carcinogenesis,** v. 25, n. 3, p. 439-43, Mar 2004. ISSN 0143-3334.

118. TERRACCIANO, L. M.; SALVATORE, P.; CHARLOTTE, K. Y. N. Hepatocellular Carcinoma: Pathology and Genetics. **Encyclopedia of Cancer**, n. 3, p. 12, 2019.

119. THOMEER, M. G. et al. Hepatocellular adenoma: when and how to treat? Update of current evidence. **Therap Adv Gastroenterol,** v. 9, n. 6, p. 898-912, Nov 2016. ISSN 1756-283X.

120. TRABER, P. G. et al. Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liver disease. **PLoS One,** v. 8, n. 10, p. e75361, 2013. ISSN 1932-6203.

121. TSUCHIDA, T.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol,** v. 14, n. 7, p. 397-411, Jul 2017. ISSN 1759-5053.

122. TSUKADA, S.; PARSONS, C. J.; RIPPE, R. A. Mechanisms of liver fibrosis. **Clin Chim Acta,** v. 364, n. 1-2, p. 33-60, Feb 2006. ISSN 0009-8981.

123. VIJAY, A.; ELAFFANDI, A.; KHALAF, H. Hepatocellular adenoma: An update. **World J Hepatol,** v. 7, n. 25, p. 2603-9, Nov 2015. ISSN 1948-5182.

124. WALLER, L. P.; DESHPANDE, V.; PYRSOPOULOS, N. Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review. **World J Hepatol,** v. 7, n. 26, p. 2648-63, Nov 2015. ISSN 1948-5182..

125. WANG, F. et al. MicroRNA-19a/b regulates multidrug resistance in human gastric cancer cells by targeting PTEN. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 434, n. 3, p. 688-94, May 2013. ISSN 1090-2104.

126. WEISKIRCHEN, R. Hepatoprotective and Anti-fibrotic Agents: It's Time to Take the Next Step. **Front Pharmacol,** v. 6, p. 303, 2015. ISSN 1663-9812.

127. WU, Y. W.; FANG, H. L.; LIN, W. C. Post-treatment of Ganoderma lucidum reduced liver fibrosis induced by thioacetamide in mice. **Phytother Res,** v. 24, n. 4, p. 494-9, Apr 2010. ISSN 1099-1573.

128. WYNN, T. A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nat Med,** v. 18, n. 7, p. 1028-40, Jul 2012. ISSN 1546-170X.

129. XIANG, S. et al. Oval cell response is attenuated by depletion of liver resident macrophages in the 2-AAF/partial hepatectomy rat. **PLoS One,** v. 7, n. 4, p. e35180, 2012. ISSN 1932-6203.

130. XU, R.; ZHANG, Z.; WANG, F. S. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. **Cell Mol Immunol,** v. 9, n. 4, p. 296-301, Jul 2012. ISSN 2042-0226.

131. YANGUAS, S. C. et al. Experimental models of liver fibrosis. **Arch Toxicol,** v. 90, n. 5, p. 1025-1048, May 2016. ISSN 1432-0738.

132. ZHANG, J. et al. Pleiotropic functions of glutathione S-transferase P. **Adv Cancer Res,** v. 122, p. 143-75, 2014. ISSN 2162-5557.

133. ZHANG, M. F. et al. Correlation between expression of p53, p21/WAF1, and MDM2 proteins and their prognostic significance in primary hepatocellular carcinoma. **J Transl Med,** v. 7, p. 110, Dec 2009. ISSN 1479-5876.

134. ZHOU, W. C.; ZHANG, Q. B.; QIAO, L. Pathogenesis of liver cirrhosis. **World J Gastroenterol,** v. 20, n. 23, p. 7312-24, Jun 2014. ISSN 2219-2840.

135. ZHOU, Z.; XU, M. J.; GAO, B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. **Cell Mol Immunol,** v. 13, n. 3, p. 301-15, 05 2016. ISSN 2042-0226.

Anexo 1 –Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF **87.2015-P507**

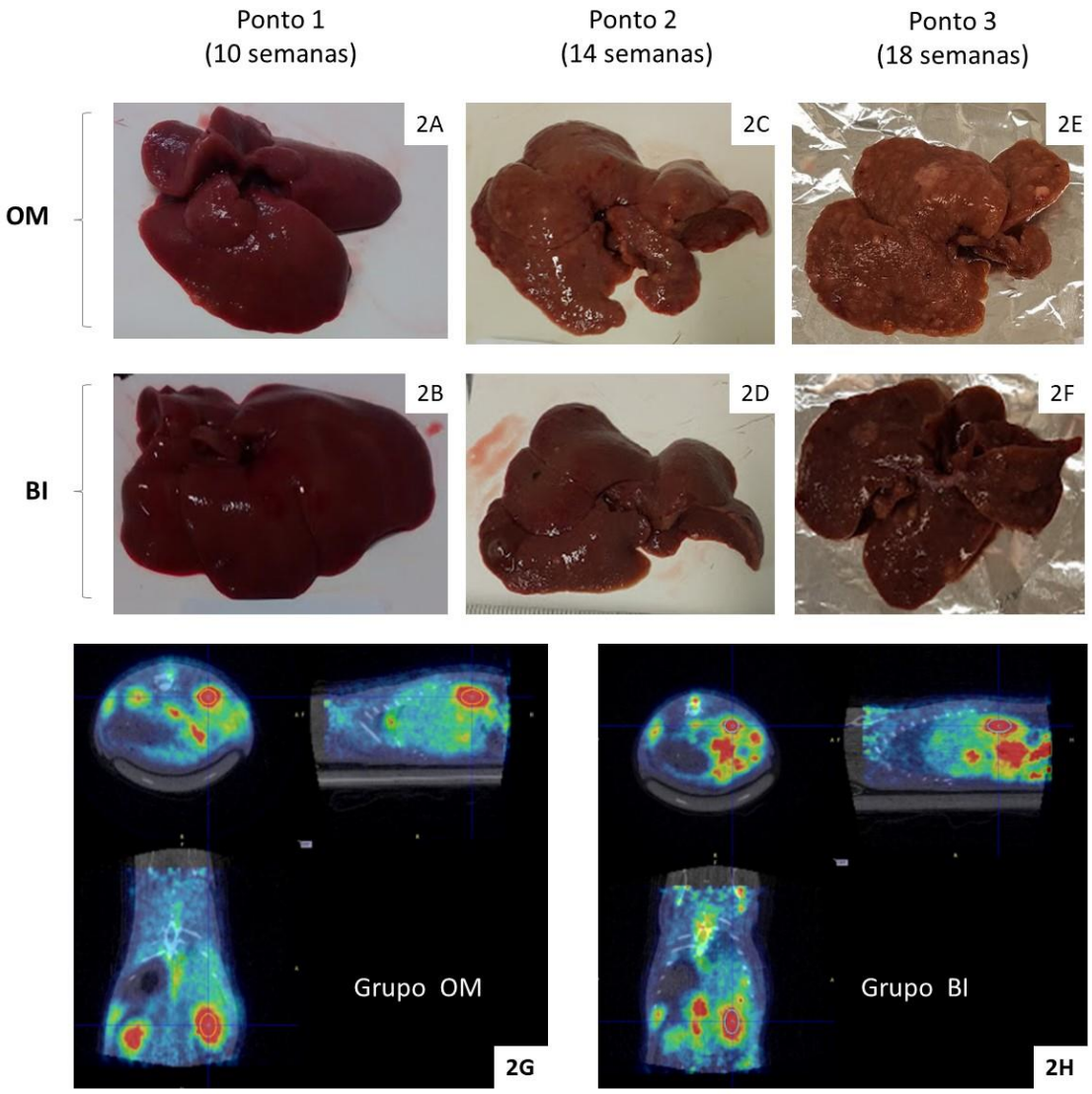
CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Eventual efeito quimiopreventivo da Beta-Ionona na hepatocarcinogênese associada à cirrose hepática**" (Protocolo CEUA/FCF/507), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Mayara Lilian Paulino Miranda**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de **18 de setembro de 2015**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 17 de novembro de 2015.

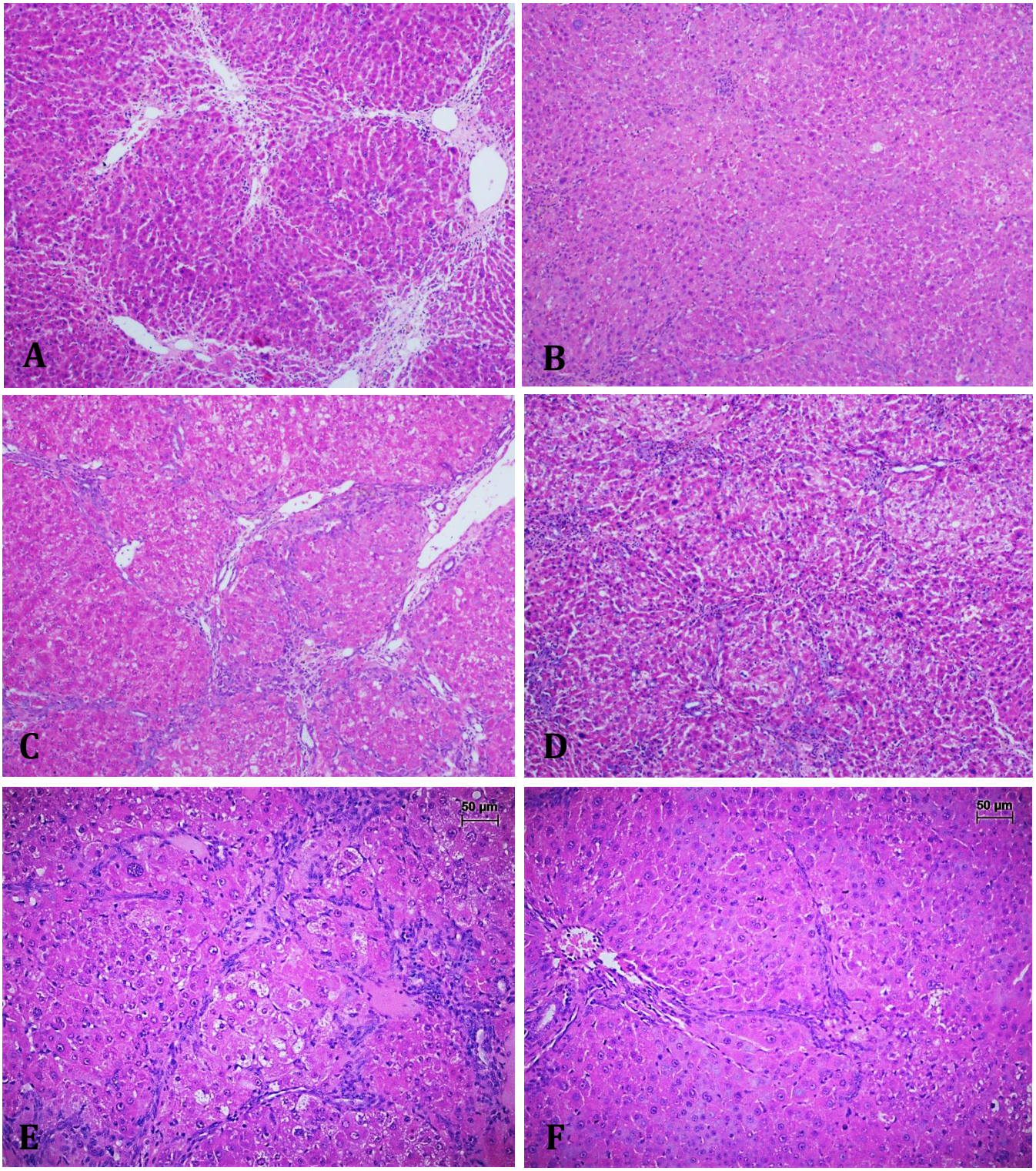
Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Anexo 2 – Imagens representativas do fígado dos animais eutanasiados na 10ª semana (P1), 14ª semana (P2) e 18ª semana (P3) e de neoplasias identificadas por 18F-FDG



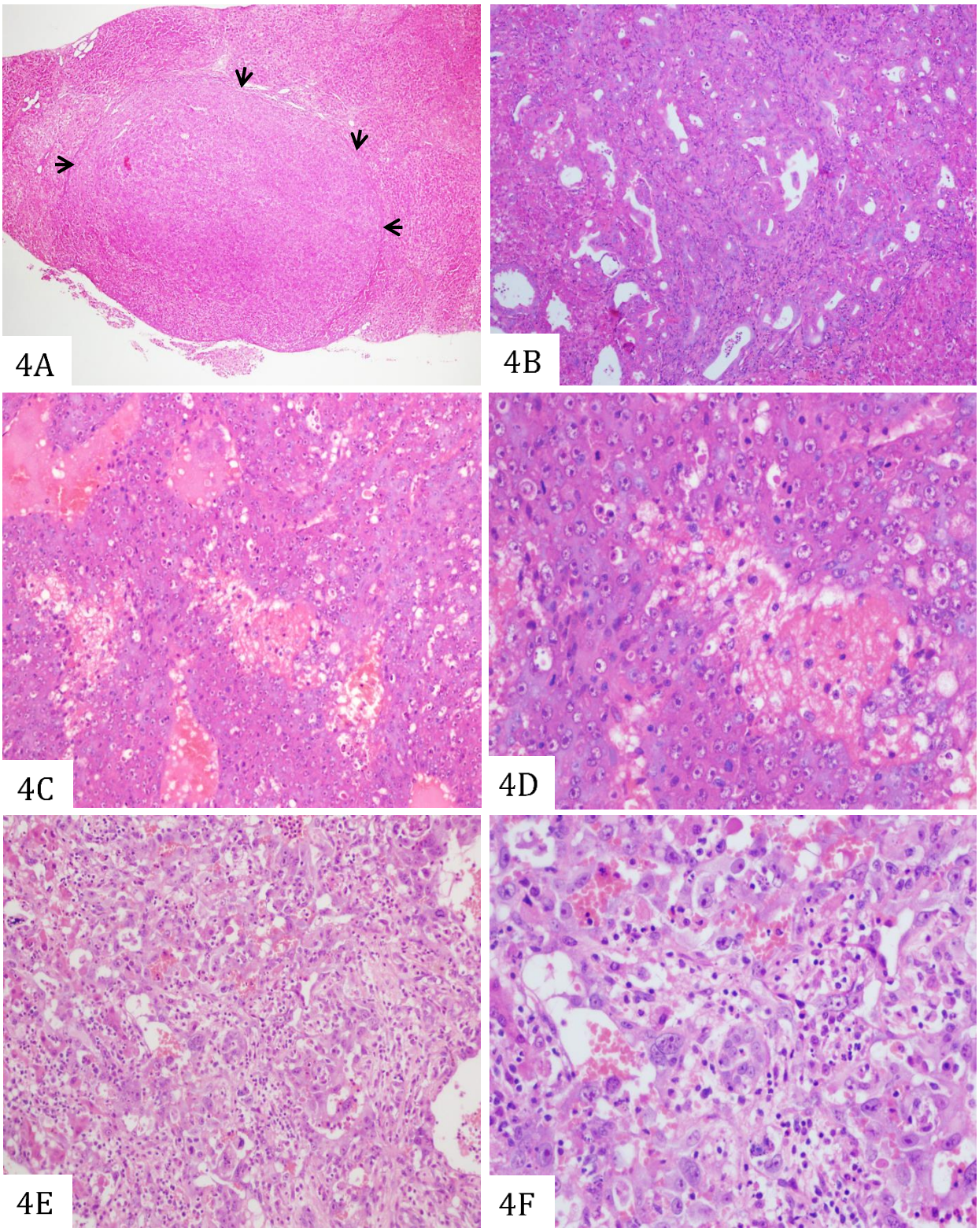
Anexo 2: Imagens macroscópicas representativas dos fígados de animais dos grupos OM e BI eutanasiados na 10ª, 14ª e 18ª semanas (2ª-F). Imagens representativas (2G-H) da quantificação do número de neoplasias identificadas por 18F-FDG PET no fígado dos animais eutanasiados na 18ª semana dos grupos OM e βI.

Anexo 3 – Imagens representativas do grau de fibrose



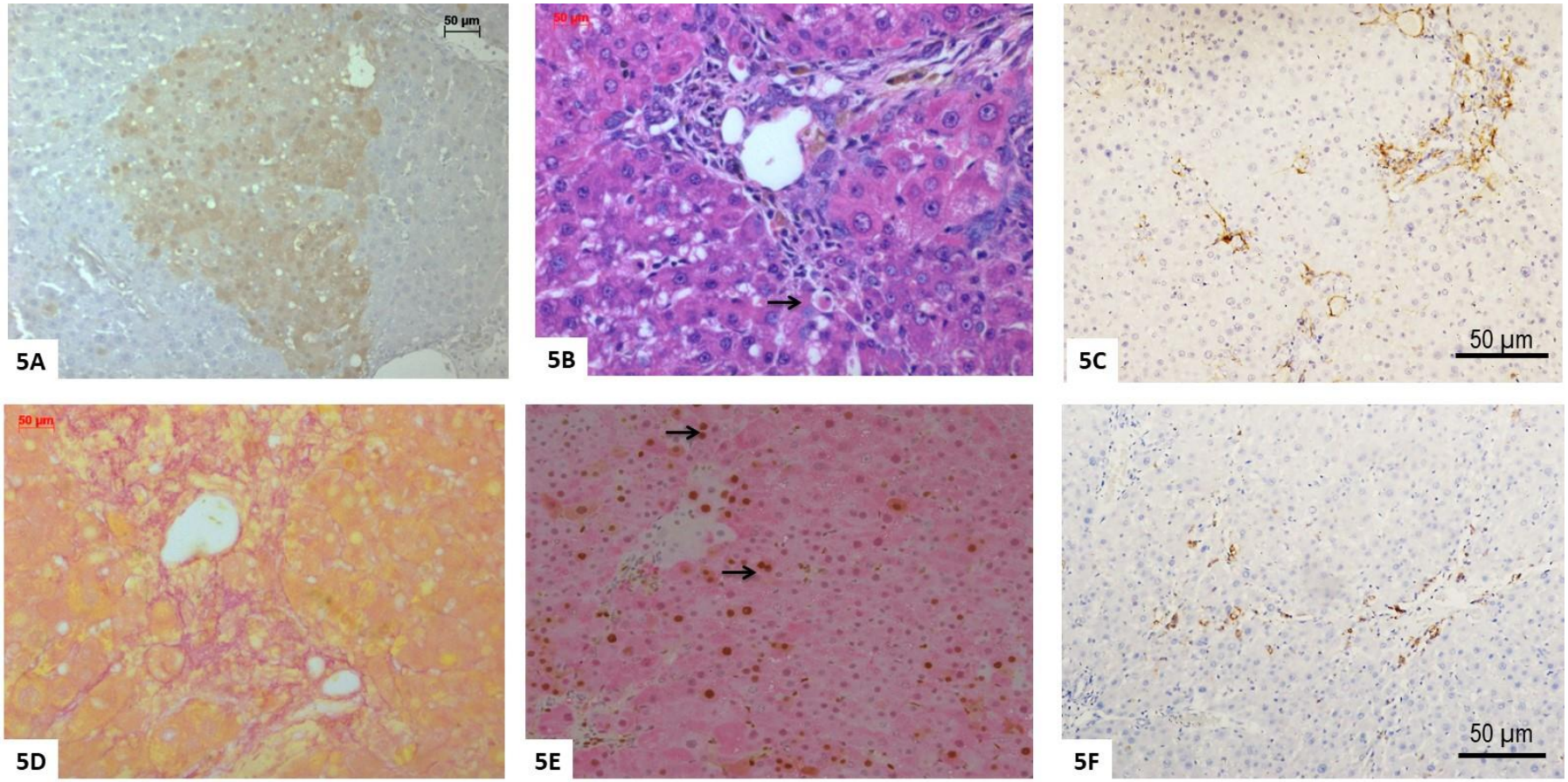
Anexo 3- Imagens representativas de cortes histológicos de fígado corado pela HE de do fígado de animais dos grupos OMP1(A), BIP1(B), OMP2 (C) e BIP2 (D), OMP3 (E) e BIP3(F), (objetiva 20x).

Anexo 4 – Imagens representativas de ADH, CCA e HCC (*low* e *high*)



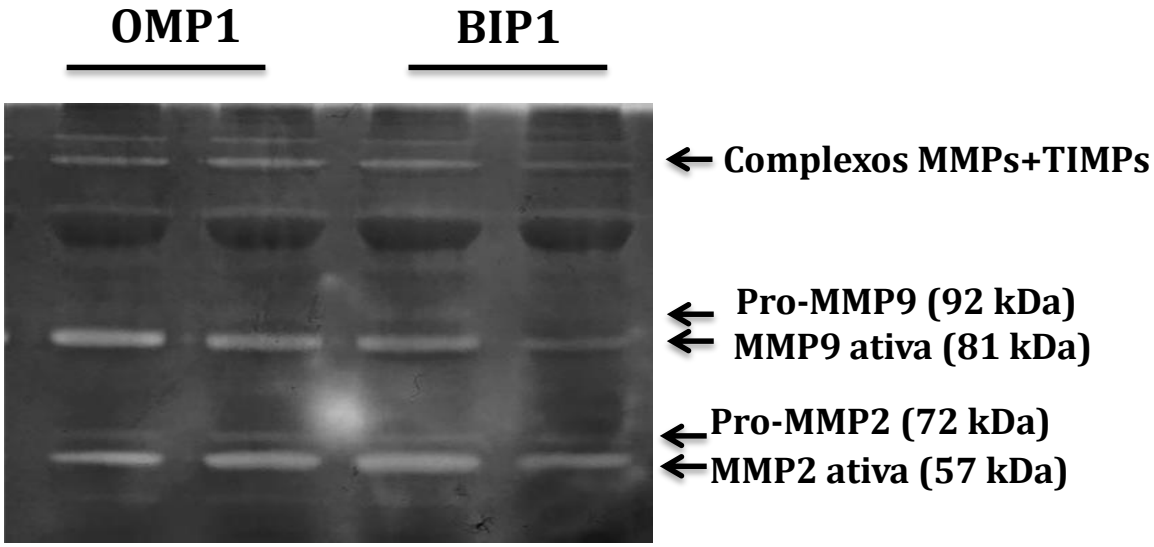
Anexo 4: Imagens representativas de cortes histológicos de fígado corado pela H&E 4A- Adenoma hepatocelular (objetiva 4x); 4B- Colangioma (objetiva 40x). Imagens representativas de Carcinoma hepatocelular (HCC) de baixo 4C (objetiva 20x) e 4D (objetiva 40x); e HCC de alto grau baixo 4E (objetiva 20x) e 4F (objetiva 40x).

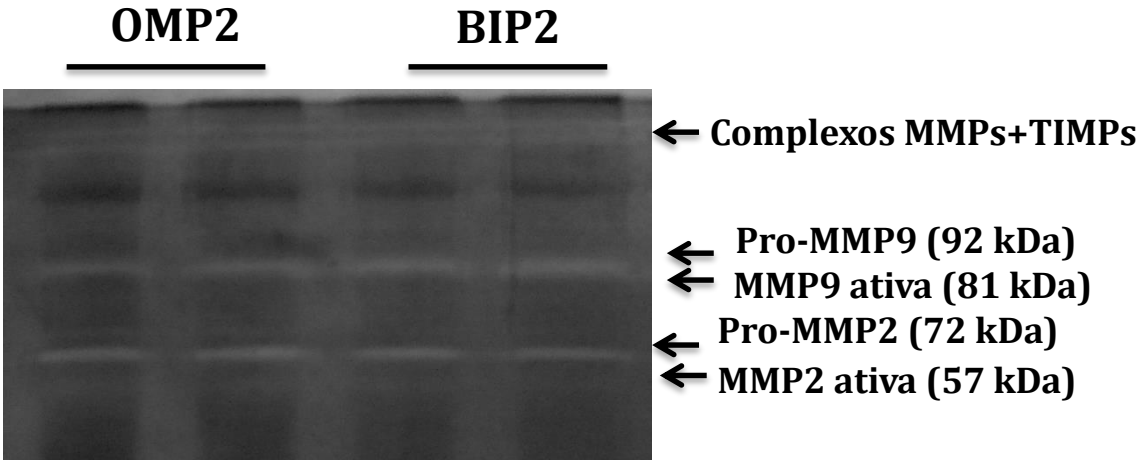
Anexo 5 – Imagens representativas de GST-P, Apoptose, PCNA, Picrosirius, CD68+ e α- SMA.



Anexo 5: Imagens microscópicas representativas de: 5A- marcação para GST-P (Objetiva 40x); 5B– hepatócito em apoptose (Objetiva 40x); 5C- marcação para α – SMA (Objetiva 20x); 5D- marcação para picrosírius (Objetiva 20x); 5E- dupla marcação GST-P e PCNA (Objetiva 20x); 5F- marcação para CD68+ (Objetiva 20x).

Anexo 6 – Imagens representativas de gel de zimografia.





Anexo 4: Imagens representativas de géis de zimografia identificadas as MMPs 2 e 9 e suas subunidades.

Anexo 7 - Ficha do Aluno

Universidade de São Paulo
Brasil

Login

Aluno(a)
Mayara Lilian Paulino Miranda
NUSP : 8686894
Sair

Apresentação

- Apresentação
- Vídeos tutoriais

+ Acesso público

+ Senha

+ Pessoa

+ Informações pessoais

- Aluno regular

- Ficha do aluno
- Bolsas
- Emissão de documentos
- Programa USP iFriends
- Validação de dados

+ PAE

+ Matrícula

+ Cartões USP

- Avisos
- Mapa do *site*
- E-mails automáticos
- Quem São

- Portal Alumni

NUSP: 8686894 Nome: Mayara Lilian Paulino Miranda

Ficha do Aluno

	Curso	Área	Nº Sequencial	Situação	Visualizar
	Mestrado	Nutrição Experimental (9132)	1	Titulado	
➔	Doutorado	Nutrição Experimental (9132)	2	Matrícula de Acompanhamento	

Preparar para imprimir

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 8686894/2 - Mayara Lilian Paulino Miranda

Email:	mayaralpm@usp.br
Data de Nascimento:	29/06/1990
Cédula de Identidade:	RG - 46.671.683-7 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Nutricionista - Universidade Estadual de Campinas - São Paulo - Brasil - 2013
Mestrado:	Mestra em Ciências - Área: Nutrição Experimental - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2015

Curso:	Doutorado
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Nutrição Experimental
Data de Matrícula:	17/08/2015
Início da Contagem de Prazo:	17/08/2015
Data Limite para o Depósito:	19/08/2019
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Fernando Salvador Moreno - 17/08/2015 até o presente. Email: rmoreno@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 17/08/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 17/10/2017
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 17/08/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019
Impresso em: 20/06/2019 21:05:27

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 8686894/2 - Mayara Lilian Paulino Miranda

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EDM5791-7/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo) (1)	10/03/2015	20/04/2015	60	4	83	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBA0417 Nutrição Humanos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2)	04/02/2016	02/07/2016	-	3	-	-	-	-
FBC5753-3/2	Processos de Invasão Celular	01/03/2016	11/04/2016	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BIP5700-7/2	Preparação Pedagógica em Biologia (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	02/05/2016	22/05/2016	45	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5753-1/2	Nutrigenômica e Programação das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis	26/09/2016	02/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
VPT5781-1/3	Hepatologia Experimental e Comparada (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	10/10/2016	13/11/2016	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5776-5/3	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	17/10/2016	30/10/2016	30	2	80	A	N	Concluída
FBA5905-1/1	Planejamento Experimental e Análise Multivariada	13/02/2017	26/02/2017	60	4	100	B	N	Concluída
BMH5774-1/1	Metabolismo da Célula Tumoral (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/04/2017	15/05/2017	60	4	100	A	N	Concluída
HNT5759-3/1	Genômica Nutricional no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	26/09/2017	31/10/2017	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5896-7/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição II	17/11/2017	25/01/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5897-3/2	Nutrigenômica do Câncer	19/02/2018	25/02/2018	30	2	100	A	N	Concluída
ICB5752-1/4	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	25/06/2018	08/07/2018	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	23
Estágios:			
Total:	0	20	23

Créditos Atribuídos à Tese: 172

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a).

2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 01/02/2017.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019
Impresso em: 20/06/2019 21:05:27

Anexo 8 - Currículo Lattes

Mayara Lilian Paulino Miranda

Endereço Profissional:	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Avenida Professor Lineu Prestes Butantã CEP:05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913630
Endereço eletrônico:	mayaralpm@usp.br mlpmiranda@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2015-2019 Doutorado em Alimentos e Nutrição Experimental.
Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
Título: Eventual efeito quimiopreventivo da Beta-ionona na hepatocarcinogênense associada a cirrose hepática
Orientador: Fernando Salvador Moreno
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2013 - 2015 Mestrado em Ciências dos Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Eventual efeito quimiopreventivo da β-ionona na hepatocarcinogênese associada ao desenvolvimento de esteatohepatite não alcóolica em ratos Wistar, Ano de obtenção: 2015
Orientador: Fernando Salvador Moreno
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2009 - 2012 Graduação em Nutrição.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
Título: Indução da apoptose em xenoenxerto tumoral de células de melanoma em camundongos por meio da suplementação de óleo de peixe
Orientador: Maria Carolina Santos Mendes
http://lattes.cnpq.br/81855570

Formação complementar

2018 - 2018 Short Course Next Generation Sequencing in diagnostics. (Carga horária: 35h). Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, CEGH-CEL, Brasil

2018 - 2018 Curso de curta duração em Nutrigenetics, Nutrigenomics and Precision Nutrition Short Course. (Carga horária: 40h). University of North Carolina, Charlotte, UNC, Estados Unidos

2016 - 2016 Extensão Universitária em Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular. (Carga horária: 40h). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

2014 - 2014 Biologia Molecular da Transformação Maligna. (Carga horária: 210h).
Instituto de Química - Universidades de São Paulo, IQ - USP, Brasil

2012 - 2012 Curso de curta duração em Treinamento em Biossegurança. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Nutrição Clínica 1: Triagem e Avaliação do Estads. (Carga horária: 3h). Mega Evento Nutrição, MEN, Brasil

Atuação profissional

1. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo FCF/USP**

Vínculo institucional

2015 – Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Doutoranda, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

07/2018 - 11/2018 Aperfeiçoamento
Especificação:
Programa de Aperfeiçoamento Didático - Disciplina de Bromatologia e Tecnologia de Alimentos - FCF/USP

02/2016 - 07/2016 Aperfeiçoamento
Especificação:
Programa de Aperfeiçoamento Didático - Disciplina Nutrição Humana - FCF/USP

---

2. Universidade Municipal de São Caetano do Sul - USCS

Vínculo institucional

2019 - 2019 Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento funcional: Professora convidada, Regime: Parcial
Outras informações:
Pós Graduação Alimentos Funcionais Aplicados à Clínica, Esporte e Nutrigenômica Módulo: Nutrigenômica Aplicada à Prática Clínica I e II

2018 - 2018 Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento funcional: Professora Convidada, Regime: Parcial
Outras informações:
Pós Graduação Alimentos Funcionais Aplicados à Clínica, Esporte e Nutrigenômica Módulo: Nutrigenômica Aplicada à Prática Clínica I e II

Áreas de atuação

1. Nutrição
2. Nutrigenômica
3. Bioquímica da Nutrição

Prêmios e títulos

2017 Menção honrosa, XXII Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ USP

2012 4º PRÊMIO LINDA JORGE KALIL BUSSADORI PARA ESTUDANTES DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL, Conselho Regional de Nutrição 3ª Região SP-MS

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **MIRANDA, M. L. P.**; KAMIJI, M. M.; TOREZZAN, C.; MORAES, A. E. A. Avaliação antropométrica e análise do consumo alimentar de universitários da Faculdade de Ciências Aplicadas – UNICAMP. Revista Segurança Alimentar e Nutricional. v.21, p.461 - 468, 2014.

2. HEIDOR, R.; FURTADO, K. S.; ORTEGA, J. F.; OLIVEIRA, T. F.; TAVARES, P. E. L. M.; VIERA, A.; **MIRANDA, M. L. P.**; PURGATTO, E.; MORENO, F. S. The chemopreventive activity of the histone deacetylase inhibitor tributyrin in colon carcinogenesis involves the induction of apoptosis and reduction of DNA damage. Toxicology and Applied Pharmacology. v.276, p.129 - 135, 2014.

Artigos aceitos para publicação

1. **MIRANDA, MAYARA LILIAN PAULINO**; FURTADO, KELLY SILVA; DE OLIVEIRA ANDRADE, FÁBIA; HEIDOR, RENATO; DA CRUZ, RAQUEL SANTANA; NOGUEIRA, MARINA SAYURI; DE CASTRO, INAR ALVES; PURGATTO, EDUARDO; BARBISAN, LUIS FERNANDO; MORENO, FERNANDO SALVADOR β-ionone inhibits nonalcoholic fatty liver disease and its association with hepatocarcinogenesis in male Wistar rats. CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS, 2019.

2. ANDRADE, FABIA DE OLIVEIRA; FURTADO, KELLY SILVA; HEIDOR, RENATO; SANDRI, SILVANA; HEBEDA, CRISTINA BICHELS; **MIRANDA, MAYARA LILIAN PAULINO**; FERNANDES, LAURA HELENA GASPARINI; YAMAMOTO, ROBERTO CARVALHO; HORST, MARIA ADERUZA; FARSKY, SANDRA HELENA POLISELLI; MORENO, FERNANDO SALVADOR Antiangiogenic effects of the chemopreventive agent tributyrin, a butyric acid prodrug, during the promotion phase of hepatocarcinogenesis. CARCINOGENESIS, 2018.

Capítulos de livros publicados

1. **MIRANDA, M. L. P.**; FURTADO, K. S.; MORENO, F. S.Vitamina A e β-Caroteno In: As vitaminas e suas interações com o genoma

humano. International Life Sciences Institute-ILSI, 2014, v.1, p. 11-22.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MENDES, M. C. S.; PIMENTEL, G. D.; PAULINO, D. S. M.; **MIRANDA, M. L. P.**; CAMARGO, J. A.; QUARESMO, P. G.; ROPPELE, E. R.; SAAD, M. J. A.; CARVALHEIRA, J. B. C. Fish Oil reduces inflammation and induces apoptosis in mice xenografted murine melanoma cell line In: 34th ESPEN Congress, 2012, Barcelona. **Clinical Nutrition Supplements**, 2012. v.7. p.154 - 154

Apresentação de trabalho e palestra

1. **Miranda, Mayara Lilian Paulino** Efeito quimiopreventivo da ß-ionona na hepatocarcinogênese associada à fibrose hepática, CONAN-2019. **(Apresentação de Trabalho)**

2 **Miranda, Mayara Lilian Paulino** Alimentos e nutrientes: Dialogando com nossos genes, FCF/USP-2018. **(Palestra)**

3. **Miranda, Mayara Lilian Paulino** Conceitos básicos em Nutrigenômica e Nutrigenética, FCM/UNICAMP-2018. **(Palestra)**

4. **Miranda, Mayara Lilian Paulino** Introdução ao Câncer, FCA/UNICAMP-2018. **(Palestra)**

5. **Miranda, Mayara Lilian Paulino** Conceitos básicos em nutrigenômica e nutrigenética, FCM/UNICAMP-2017. **(Palestra)**

6. **Miranda, Mayara Lilian Paulino**. I Congresso Nacional de Nutrição, Saúde e Sustentabilidade - I CONNUTSS; V SENUT; III FEIRA DE NUTRIÇÃO - II FENUT, UFPI - 2016. **(Palestra)**

7. **Miranda, Mayara Lilian Paulino**. Implicações da Vitamina A e Beta- Caroteno no genoma humano, GANEPAO-2016. **(Palestra)**

8. **MIRANDA, M. L. P.;** FURTADO, K. S.; HEIDOR, R.; NOGUEIRA, M. S.; CASTRO, I. A.; BARBISAN, L. F.; MORENO, F. S. CHEMOPREVENTIVE EFFECT OF BETA-IONONE IN HEPATOCARCINOGENESIS ASSOCIATED OF NOT TO THE DEVELOPMENT OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS IN WISTAR RATS, 2014. **(Apresentação de Trabalho)**

9. **Miranda, Mayara Lilian Paulino**. Hepatocarcinogênese

modulada por carotenóides, FCA/UNICAMP-2014. **(Palestra)**

10. **Miranda, Mayara Lilian Paulino**. Nutrição na Pesquisa do Câncer, FCA/UNCAMP-2014. **(Palestra)**

11. MIRANDA, M. L. P.; SILVA, M. D.; VIDAL, J. A.; MORAES, A. E. A. PERFIL ANTROPOMÉTRICO E AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR DE ALUNOS DA FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS/UNICAMP, 2011. **(Apresentação de Trabalho)**

12. MIRANDA, M. L. P.; LANA, C. C.; FANTE, T.; BORIN, J. P.; MORAES, A. E. A. PERFIL ANTROPOMÉTRICO DOS ALUNOS DA FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS/UNICAMP, 2010. **(Apresentação de Trabalho)**

Eventos

Participação em eventos

1. Avanços em nutrição: Nutrição Clínica e Epidemiologia Nutricional, 2012. **(Simpósio)**

2. Modelos de Assistência Nutricional Hospitalar no Século XXI, 2012. **(Simpósio)**

3. Fórum de Obesidade e Diabetes, 2011. **(Simpósio)**

4. I Simpósio Acadêmico de Diabetes Mellitus, 2011. **(Simpósio)**

5. IV Congresso de Mineiro de Alimentação e Nutrição e do I Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição, 2011. **(Congresso)**

6.XIX Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP, 2011. **(Congresso).**

7. 3º Simpósio sobre Obesidade na Infância e Adolescência do HC-USP Faculdade de Medicina e Liga e Obesidade Infantil, 2010. **(Simpósio)**

8. **Mega Evento em nutrição** 2010. **(Congresso)**

9. V Jornada de Nutrição e Metabolismo realizada pelo curso de Nutrição e Metabolismos da Faculdade de Medicina de Riberão Preto FMRP-USP, 2010. **(Congresso)**

10. XVIII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 2010. **(Congresso)**

11. Coma para Alimentar seus Genes: uma abordagem personalizada da nutrigenômica, 2009. **(Simpósio)**

12. IV Congresso de Nutrição da Faculdade de Nutrição de Riberão Preto, 2009. **(Congresso)**

13. IV Jornada de Nutrição e Metabolismo realizada pelo curso de Nutriçao e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Riberão Preto FMRP-USP, 2009. **(Congresso)**