

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

**LIPÍDIOS ESTRUTURADOS OBTIDOS POR INTERESTERIFICAÇÃO DA
TRIBUTIRINA COM ÓLEO DE LINHAÇA E SEU POTENCIAL
QUIMIOPREVENTIVO DURANTE A FASE DE PROMOÇÃO INICIAL DA
HEPATOCARCINOGENESE EXPERIMENTAL**

Juliana Festa Ortega

Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Orientador: Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**LIPÍDIOS ESTRUTURADOS OBTIDOS POR INTERESTERIFICAÇÃO DA
TRIBUTIRINA COM ÓLEO DE LINHAÇA E SEU POTENCIAL
QUIMIOPREVENTIVO DURANTE A FASE DE PROMOÇÃO INICIAL DA
HEPATOCARCINOGENESE EXPERIMENTAL EM RATOS**

Versão corrigida

Juliana Festa Ortega

Tese para obtenção do Título de DOUTORA
Orientador: Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo

2015

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

O77L	<p>Ortega, Juliana Festa</p> <p>Lipídios estruturados obtidos por interesterificação da tributirina com óleo de linhaça e seu potencial quimiopreventivo durante a fase de promoção inicial da hepatocarcinogênese experimental / Juliana Festa Ortega. - São Paulo, 2015. 90p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Orientador : Moreno, Fernando Salvador</p> <p>1. Alimentos funcionais : Ciência dos alimentos 2. Carcinoma hepatocelular I. T. II. Moreno, Fernando Salvador, orientador.</p> <p style="text-align: right;">641.1 CDD</p>
------	--

Juliana Festa Ortega

Lipídios estruturados obtidos interesterificação da tributirina com
óleo de linhaça e seu potencial quimiopreventivo durante a fase
de promoção inicial da hepatocarcinogênese experimental em
ratos

Comissão Julgadora da

Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

Orientador/presidente

Prof. Dr. Bruno Cogliatti

1º. examinador

Profa.Tit. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira

2º. examinador

Profa. Tit. Maria Lucia Zaidan Dagli

3º. examinador

Profa. Dra. Juliana Neves Rodrigues Ract

4º. examinador

São Paulo, 08 de janeiro de 2016.

Resumo

Ortega, J.F. **Lipídios estruturados obtidos por interesterificação da tributirina com óleo de linhaça e seu potencial quimiopreventivo durante a fase de promoção inicial da hepatocarcinogênese experimental em ratos**. 2015. 90f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A combinação de agentes quimiopreventivos com diferentes mecanismos de ação tem sido considerada uma estratégia promissora para a prevenção do câncer. Dentre os diversos compostos bioativos em alimentos, destacam-se a tributirina, um pró-fármaco do ácido butírico presente em laticínios e produzido pela fermentação de fibras dietéticas, e o óleo de linhaça, fonte de ácido alfa linolênico. Nesse contexto, foi avaliada a atividade quimiopreventiva de lipídios estruturados obtidos a partir da interesterificação enzimática de tributirina e óleo de linhaça durante a fase de promoção inicial da hepatocarcinogênese experimental. Ratos Wistar machos submetidos ao modelo do hepatócito resistente receberam diariamente, por via intragástrica (i.g), maltodextrina, óleo de linhaça, tributirina, a mistura não esterificada ou lipídios estruturados durante a fase de promoção inicial. O tratamento com lipídios estruturados demonstrou atividade quimiopreventiva comparável à da tributirina, mesmo resultando em menor concentração hepática de ácido butírico. Tanto a tributirina quanto os lipídios estruturados não inibiram a proliferação celular em lesões preneoplásicas, mas induziram a apoptose naquelas em remodelação. Os efeitos inibitórios da tributirina em fases iniciais da hepatocarcinogênese experimental estão relacionados ao aumento da acetilação de histonas e à modulação de processos de translocação nuclear da p53. No presente estudo, foi observado aumento substancial da razão nuclear/citoplasmática de p53 e importina-alfa em fígados de animais submetidos ao modelo e tratados com tributirina, mas não nos tratados com lipídios estruturados. Por outro lado, o tratamento com lipídios estruturados reduziu a expressão dos oncogenes *Bcl2*, *Ccnd2*, *Pdgfa*, *Vegfa* e aumentou a expressão dos genes supressores de tumor *Cdh13*, *Fhit* e *Socs3*. Assim, embora o potencial quimiopreventivo dos lipídios estruturados seja comparável ao da tributirina, os resultados sugerem que o novo composto não exibe atividade de HDACi, e que seus efeitos inibitórios na hepatocarcinogênese possam ser atribuídos à modulação da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor.

Palavras-chaves: carcinoma hepatocelular, quimioprevenção, tributirina, óleo de linhaça, lipídios estruturados, apoptose, mecanismos epigenéticos, expressão gênica.

Abstract

Ortega, J.F. **Structured lipids obtained from intersterification of tributyrin and flax seed oil and their chemopreventive potential during early promotion phase of experimental hepatocarcinogenesis in rats**. 2015. 90f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Combination of chemopreventive agents with different mechanisms of action has been considered a promising strategy to cancer prevention. Among several bioactive food compounds, tributyrin, a butyric acid prodrug obtained from dairy products and dietetic fiber fermentation, and flax seed oil, a rich source of alpha linolenic acid have shown chemopreventive potential. Here, we evaluated the chemopreventive activity of structured lipids obtained by enzymatic interesterification of tributyrin and flax seed oil during the early promotion phase of experimental hepatocarcinogenesis. Male Wistar rats subjected to the resistant hepatocyte model were treated daily, i.g, with maltodextrin, flax seed oil, tributyrin, non-sterified blend, or structured lipids. Treatment structured lipids showed similar chemopreventive activity compared to tributyrin, even when structured lipids yielded lower concentrations of butyric in the liver. Tributyrin and structured lipids did not inhibit cell proliferation in preneoplastic lesions, but both of them induced apoptosis in remodeling preneoplastic lesions. In addition, histone acetylation and p21 restored expression tributyrin molecular mechanisms were related to modulation of p53 nuclear shuttling mechanisms. In the present study, it was observed a substantial increase in p53 nuclear/cytoplasmic ratio and importin-alpha in preneoplastic livers of tributyrin treated rats, but not in those treated with structured lipids. In contrast, treatment structured lipids downregulated expression of major oncogenes *Bcl2*, *Ccnd2*, *Pdgfa*, and *Vegfa*; and upregulated expression of critical tumor suppressor genes, *Cdh13*, *Socs3* and *Fhit*. Hence, although structured lipids and tributyrin show similar chemopreventive potential, the results suggest that the new compound does not exhibit HDACi activity, and that its inhibitory effects may be attributed to the modulation of oncogenes and tumor suppressor genes expression.

Keywords: hepatocellular carcinoma, chemoprevention, tributyrin, flax seed oil, structured lipids, apoptosis, epigenetic mechanisms, gene expression.

**Aos meus pais, Márcia e Benjamin,
Que sempre apoiaram minha busca pelo conhecimento.**

Agradecimentos

À Deus, que ilumina os meus caminhos e pensamentos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e pela bolsa de doutorado (Processo no. 2012/00498-6), sem os quais seria inviável o desenvolvimento do projeto.

Aos meus pais Márcia e Benjamin, pois são os principais responsáveis por quem sou hoje e por eu nunca ter desistido dos meus sonhos e valores. Agradeço todo o apoio ao meu espírito científico, desde as minhas primeiras experiências com papel e fogo até meu primeiro microscópio. Ao meu irmão Bruno, meu primeiro colega de pesquisas, por me apoiar e oferecer “voluntariamente” seus brinquedos em prol da ciência. E à minhas “irmãs”, Tilly, *in memoriam*, Miah, Marie e Mel, agradeço a companhia silenciosa e atenção á todos os ensaios de apresentação. Aos meus avós, José e Maria, *in memoriam*, e Sebastião e Glória por me incentivarem, me acolherem e se orgulharem de mim, mesmo sem entender o que eu faço. Á minha madrinha Maria Cristina por me manter sempre próxima à Deus e, ao meu padrinho Sílvio, que me deu meu primeiro laboratório de química. A todos vocês meu amor incondicional e saudades eternas.

Ao meu melhor amigo e noivo Ricardo, por sua calma, companheirismo, paciência e compreensão. Seu apoio, incentivo e presença nos momentos difíceis foram essenciais para o meu sucesso. Eu poderia ser doutora sem ele, mas provavelmente todo o processo seria mais triste e penoso.

Às minhas melhores amigas, Aline e Eduarda por tentarem manter minha vida social ativa e compreenderem todas as vezes que tive de dizer não para trabalhar ou viajar.

Ao professor Fernando Salvador Moreno, meu orientador, por acreditar no meu potencial e me acolher em seu laboratório. Agradeço por compartilhar o seu conhecimento, pelos desafios e oportunidades que me amadureceram pessoal e cientificamente. Sempre foi e será uma grande honra trabalhar ao lado de uma grande referência nessa área de pesquisa.

À Dra. Kelly Silva Furtado pelo imenso conhecimento compartilhado diariamente com paciência e doçura, e todas as correções exaustivas de trabalhos, capítulos de livro e textos. Um grande exemplo de pós-doutoranda e pesquisadora a ser seguido.

Ao Dr. Igor Pogribny pela oportunidade de executar projetos como pesquisadora visitante no National Center for Toxicological Research/FDA – EUA e; à sua equipe, Dra. Aline de Conti,

Dra. Svitlana Shypleva e Dr. Volodymir Tryndyak, por me acolherem e compartilharem sua experiência científica.

Aos professores Juliana Ract e Luís Antônio Gioielli pelo auxílio na síntese e caracterização de lipídios estruturados.

Ao professor Eduardo Purgatto pelas análises de concentração de ácido butírico e alfa-linolênico.

Ao técnico do laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer, parceiro de projeto e grande amigo, Renato Heidor pelo apoio diário, idéias e todos os cafés.

Aos meus queridos colegas do laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer, que direta ou indiretamente, me auxiliaram nesse trabalho e pela constante troca de experiências, conversas e risos intermináveis. Especialmente agradeço aos meus companheiros de iniciação científica Paulo Eduardo e Laura, que cresceram comigo e sempre foram meus parceiros nessa jornada, á Mayara, minha pequena irmãzinha científica, por ser tão parecida e ao mesmo tempo tão diferente de mim e, ao Ernesto, por compartilhar sua vasta experiência científica e corrigir todos os meus textos em inglês.

Aos demais colegas do departamento pela sua contribuição e suporte. Agradeço especialmente á Lurdinha por me ajudar a manter a ordem no laboratório e preparar religiosamente seu famoso café. E aos queridos Cléo, Edílson, Mônica e Roberta, por toda sua paciência e boa vontade em responder minhas questões burocráticas e urgentes.

“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é”.

(Albert Einstein)

Sumário

1. Introdução	18
1.1. Dieta, nutrição e câncer	18
1.2. Tributirina: um pró-fármaco do ácido butírico	19
1.2.1. Tributirina e quimioprevenção	21
1.3. Óleo de linhaça, fonte de ácido alfa-linolênico	23
1.3.1. Ácidos graxos poli-insaturados	23
1.3.2. Óleo de linhaça e quimioprevenção	24
1.4. Aspectos moleculares da carcinogênese e quimioprevenção	25
1.4.2. Metilação do DNA	28
1.4.2. Modificações em histonas	28
1.4.3. Acetilação de proteínas não histonas	29
1.4.4. Modulação de eventos epigenéticos	31
1.5. Lipídios estruturados e a quimioprevenção	33
2. Objetivo	37
3. Material e métodos	37
3.1. Síntese e caracterização de lipídios estruturados	37
3.1.1. Síntese dos lipídios estruturados	37
3.1.2. Comportamento térmico: Calorimetria de fusão e cristalização	38
3.1.3. Composição em triacilgliceróis	38
3.2. Ensaio <i>in vivo</i>	38
3.2.1. Protocolo Experimental	38
<i>Eutanásia dos animais</i>	41
3.2.2. Análise macroscópica	41
3.3. Dupla marcação imunoistoquímica	41
<i>Análise morfométrica de lesões preneoplásicas GSTP+</i>	42

<i>Análise da proliferação celular</i>	42
3.4. Análise de apoptose	43
3.5. Determinação das concentrações dos ácidos butírico e alfa-linolênico.....	43
3.6. Western Blot	44
3.7. Análise da expressão gênica por real time-PCR	44
(Real Time Polymerase Chain Reaction).....	44
3.8. Análise de expressão gênica por real time-PCR arrays.....	45
3.9. Análise estatística	45
4. Resultados.....	46
4.1. Caracterização dos lipídios estruturados.....	46
4.1.1. Comportamento térmico.....	46
4.1.2. Composição em triacilgliceróis.....	49
4.2. Ensaio <i>in vivo</i>	49
4.2.1. Peso corpóreo e hepático dos animais.....	49
4.2.2. Análise macroscópica do fígado de animais submetidos ao protocolo experimental	52
4.2.3. Análise morfológica de lesões preneoplásicas GSTP+	52
4.2.4. Concentrações hepáticas de ácido butírico e ácido alfa-linolênico.....	54
4.3. Alvos epigenéticos.....	56
4.4. Expressão dos genes <i>Rassf1</i> , <i>Rassf5</i> e <i>Cav-1</i>	61
4.5. Efeitos dos lipídios estruturados na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento de câncer de fígado.....	62
5. Discussão	64
6. Conclusão	71
7. Referências bibliográficas	72

Apêndice 1: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado. Imunomarcação pela GST-P permite a distinção de lesões preneoplásicas (Objetiva 10X) (A) persistentes (bordas definidas e marcação uniforme) e, (B) em remodelação (bordas irregulares e marcação não-uniforme no interior do foco). (C) Dupla-marcação imunoistoquímica para GST-P (rosa) e PCNA

(marrom). A seta indica núcleo em fase S marcado para PCNA. Objetiva de 40X. (D) A seta indica hepatócito em apoptose corado por HE. Objetiva de 100X.89

Apêndice 2: Anticorpos primários utilizados e suas diluições:90

Apêndice 3: Fotografia digital em que são representados os fígados dos animais (A) não submetidos ao modelo experimental e; submetidos ao modelo RH e (B) tratados com maltodextrina, (C) óleo de linhaça, (D) tributirina, (E) mistura não esterificada ou (F) lipídios estruturados. As setas indicam a presença de LPN hepáticas visíveis macroscopicamente.....90

Lista de Figuras

Figura 1: Os estágios básicos da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão. Durante a iniciação ocorrem alterações permanentes e irreversíveis no DNA da célula iniciada. Em contrapartida, não ocorrem mudanças moleculares na estrutura do DNA durante a promoção, por isso, é considerada uma etapa reversível. A progressão é o último estágio, caracterizado pela instabilidade cariotípica, é irreversível. 27

Figura 2: Alterações epigenéticas relacionadas à carcinogênese e sua modulação por CBAs. **(A)** Transcrição ativa. Os promotores de genes ativos transcricionalmente apresentam hipometilação de regiões CpG, acetilação de histonas e metilação de histonas H3 no resíduo de lisina 4 (H3k4 me3). **(B)** Transcrição inativa. Durante a carcinogênese, regiões promotoras de genes supressores de tumor apresentam-se, frequentemente, hipermetiladas. O silenciamento transcricional é mediado por MBDs, que se ligam às regiões CpGs metiladas e recrutam HDACs e DNMTs. Além disso, a metilação dos resíduos 9 e 27 de histonas H3 (H3k9me3 e H3k27me3) também está associada à inativação de genes. **(C)** Compostos bioativos de alimentos podem modular a atividade de DNMT, HDAC e MBD, e aumentar a acetilação de histonas e a metilação em H3k4 de regiões promotoras de genes inativos. Assim, a cromatina poderia se tornar mais acessível a fatores de transcrição. 32

Figura 3: Desenho experimental. Os animais foram submetidos ao modelo do hepatócito resistente. Os hepatócitos foram iniciados por meio de administração intraperitoneal de DEN em solução salina (NaCl a 0,9%). Após 2 semanas, os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses únicas em dias consecutivos, por gavagem, de 2-AAF dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho (20mg/Kg p.c), seguida de uma hepatectomia parcial (HP) a 70%. Os animais receberam duas doses adicionais de 2-AAF (7,5 e 20mg/Kg p.c) no segundo e quarto dias subsequentes à HP, respectivamente. Os tratamentos diários foram iniciados 3 dias após a última dose de 2-AAF. 40

Figura 4: Curvas de cristalização **(A)** e fusão **(B)** do óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de TB com LIN (MIS) ou lipídios estruturados (EST). 48

Figura 5 : Composição em triacilgliceróis do óleo de linhaça **(A)**, tributirina **(B)** e lipídios estruturados **(C)**. 50

Figura 6: Representação gráfica do controle de peso dos animais não submetidos ao modelo experimental (NI), ou submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de tributirina com óleo de linhaça (MIS) ou lipídios estruturados (EST) durante a etapa de promoção inicial da hepatocarcinogênese. Legenda: Administração de dietilnitrosamina (DEN – 200mg/kg p.c); Administração do agente promotor 2-acetilaminofluoreno (AAF - 20mg/Kg p.c e 7,5 mg/Kg p.c, respectivamente); Hepatectomia parcial 70%. 51

Figura 7: **(A)** Concentração hepática de ácido butírico (AB) e **(B)** ácido alfa-linolênico (ALA) em ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de tributirina com óleo de linhaça (MIS) ou lipídios estruturados (EST) durante a etapa de promoção inicial da hepatocarcinogênese. ^{a,b,c}: diferença em relação ao grupo CO, TB e LIN, respectivamente ($p < 0,05$); [&] comparação em relação ao

grupo CO ($p=0,06$). Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Dados expressos na forma de média \pm erro padrão da média ($n=5$). 56

Figura 8: Modificações de histonas em fígados preneoplásicos. **(A)** H3K9 ac e, **(B)** H3k4me3 **(C)** H3k9me3 **(D)** H3k27me3. A análise foi realizada com histonas extraídas de fígado de ratos Wistar não submetidos ao modelo experimental (NI) ou submetidos ao modelo RH e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura simples de óleo de linhaça e tributirina (MIS), ou lipídios estruturados obtidos a partir da esterificação do óleo de linhaça e tributirina (EST). Imagens representativas dos *imunoblots* são apresentadas. Os resultados expressos são proporcionais à expressão da histona no grupo CO. Diferença ^{a,b} em relação aos grupos CO e TB, respectivamente, segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey, $p<0,05$. Dados expressos na forma de média \pm erro padrão da média ($n=5$). 57

Figura 9: Expressão das proteínas **(A)** p21, **(B)** p53 total e **(C)** sua razão nuclear/citoplasmática, e **(D)** importina-alfa. A análise foi realizada em extrato total ou de frações citoplasmáticas e nucleares de fígado de ratos Wistar não submetidos ao modelo experimental (NI) ou submetidos ao modelo RH e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura simples de óleo de linhaça e tributirina (MIS), ou lipídios estruturados obtidos a partir da esterificação do óleo de linhaça e tributirina (EST). Imagens representativas dos *imunoblots* são apresentadas. Os resultados expressos são proporcionais à expressão da proteína no grupo CO. Diferença ^{a,b} em relação aos grupos CO e TB, respectivamente, segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey, $p<0,05$. Dados expressos na forma de média \pm erro padrão da média ($n=5$). 59

Figura 10: Expressão das proteínas **(A)** MeCP2 e **(B)** Cav-1 em fígados preneoplásicos. A análise foi realizada com proteína total extraída de fígado de ratos Wistar não submetidos ao modelo experimental (NI) ou submetidos ao modelo hepatocarcinogênese do RH e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura simples de óleo de linhaça e tributirina (MIS), ou lipídios estruturados obtidos a partir da esterificação do óleo de linhaça e tributirina (EST). Imagens representativas dos *imunoblots* são apresentadas. Os resultados expressos são proporcionais à expressão da proteína no grupo CO. Diferença ^a em relação aos grupos CO, segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey, $p<0,05$. Dados expressos na forma de média \pm erro padrão da média ($n=5$). 60

Figura 11: Quantificação da expressão dos genes **(A)** *Rassf1*, **(B)** *Rassf5* e **(C)** *Cav-1* por PCR em tempo real. A análise foi realizada em RNA total, extraído de fígado de ratos Wistar não submetidos ao protocolo experimental ou submetidos ao modelo hepatocarcinogênese do RH e tratados com maltodextrina (CO) ou lipídios estruturados obtidos a partir da esterificação do óleo de linhaça e tributirina (EST). A quantidade de RNA foi normalizada pela expressão do gene constitutivo *Gapdh*. Os resultados expressos são proporcionais à expressão do gene no grupo de animais não submetidos ao protocolo experimental (NI). Teste estatístico Anova seguido do teste de Tukey. Dados expressos na forma de média \pm erro padrão da média ($n=5$). 61

Figura 12: Genes diferencialmente expressos dentre os 84 genes analisados por PCR em tempo real empregando-se o *RT2 Profiler PCR Array - Liver Cancer Pathways*. A análise foi realizada em RNA total, extraído de fígado de ratos Wistar não submetidos ao protocolo experimental ou submetidos ao modelo hepatocarcinogênese do RH e tratados com

maltodextrina (CO), com tributirina (TB) ou lipídios estruturados obtidos a partir da esterificação do óleo de linhaça e tributirina (EST). A quantidade de RNA foi normalizada pela expressão do gene constitutivo *beta-actina*. Esquema representativo sobre o envolvimento dos genes modulados pelos tratamentos no câncer de fígado **(A)**. Resultados expressos são proporcionais à expressão do gene no grupo de animais não submetidos ao protocolo experimental (NI) **(B)** ou do grupo CO **(C)**. Diferença ^{a,b} em relação ao grupo CO e TB, respectivamente. Teste estatístico *t* de Student. 63

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Resultados obtidos a partir das curvas de cristalização e fusão do óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de tributirina com óleo de linhaça (MIS) ou lipídios estruturados (EST)..... 47
- Tabela 2:** Pesos corpóreo e hepático relativo de animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de tributirina e óleo de linhaça (MIS) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção inicial da hepatocarcinogênese, assim como sua incidência e porcentagem por tamanho de LPN hepáticas visíveis à macroscopia observadas por ocasião da eutanásia..... 53
- Tabela 3:** Análise morfométrica de lesões preneoplásicas GSTP⁺ e índices de proliferação celular e apoptose em animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de tributirina e óleo de linhaça (MIS) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção inicial da hepatocarcinogênese. 55

Lista de Abreviaturas

AGCC = ácidos graxos de cadeia curta

AGCL = ácidos graxos de cadeia longa

ALA = ácido alfa-linolênico

CBAs = compostos bioativos de alimentos

CO = grupo de animais tratados com maltodextrina, considerado controle isocalórico.

DHA = ácido docosahexanóico

EPA = ácido eicosapentaenóico

EST = grupo de animais tratado com os lipídios estruturados

HAT = acetilases de histonas

HCC = carcinoma hepatocelular

HDAC = desacetilases de histonas

HDACis = inibidores de desacetilases de histonas

HMT = metiltransferases de histonas

LIN = grupo de animais tratado com óleo de linhaça

LPN = lesões preneoplásicas

MDBs = proteínas ligadoras de domínios metilados

MIS = grupo de animais tratados com a mistura não esterificada

NI = grupo de animais não submetidos à nenhum protocolo experimental.

pLPN = lesões preneoplásicas persistentes

PUFA = ácidos graxos poli-insaturados

RH = modelo do hepatócito resistente

rLPN = lesões preneoplásicas em remodelação

TB = grupo de animais tratados com tributirina

1. Introdução

1.1. Dieta, nutrição e câncer

O câncer representa a principal causa de mortalidade, tendo contabilizado cerca de 7,6 milhões, ou 13%, das mortes no mundo apenas em 2008 (OMS, 2013). No Brasil, o número estimado para 2015 é de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer no Brasil (INCA, 2014). Nas décadas de 60 e 70, surgiram indícios de que o câncer estava relacionado a fatores ambientais, e que, portanto, poderia ser prevenido (Alcantara e Speckmann 2006). Em 1981, Doll e Peto relataram a possibilidade de prevenção do câncer a partir da observação de diferentes taxas de incidência entre os países que poderiam ser atribuídas, em parte, a fatores ambientais e estilo de vida, como tabagismo, comportamento reprodutivo, exposição ocupacional a carcinógenos e alimentação. Atualmente, cerca de 30% dos casos, justificam-se pela adoção de hábitos pouco saudáveis como: o consumo de álcool e tabaco, sedentarismo, menor consumo de frutas e legumes, assim como alto índice de massa corporal (Yu e Yuan 2004; Marrero 2005; Bosch *et al.* 2005).

Evidências epidemiológicas e experimentais reforçam a importância da dieta no desenvolvimento do câncer de pulmão, cólon, mama, próstata, estômago, bexiga, entre outros (Kelloff *et al.* 2000; Forman *et al.* 2004; Divisi *et al.* 2006). Nesses casos, o consumo de frutas, hortaliças e fibras revelou-se protetor (Doll e Peto 1981; Aggarwal e Shishodia 2006; Alcantara e Speckmann 2006; Divisi *et al.* 2006) ao contrário da ingestão de gordura e carne vermelha (Doll e Peto 1981; Divisi *et al.* 2006). O efeito protetor observado é atribuído principalmente à ação dos compostos bioativos presentes nesses alimentos (Davis e Milner 2004).

Nesse sentido, insere-se o conceito da quimioprevenção, relatado pela primeira vez por Sporn *et al.* (1976). A quimioprevenção é o método mais apropriado para se evitar o câncer e consiste na prevenção, inibição ou reversão das etapas iniciais da carcinogênese, ou seja, antes da progressão, pela administração de um ou mais compostos químicos sintéticos ou naturais (Stoner, Morse, e Kelloff 1997; Umar, Dunn, e Greenwald 2012).

1.2. Tributirina: um pró-fármaco do ácido butírico

A hipótese de que o consumo de fibras alimentares, presentes em frutas e hortaliças, possa modular o desenvolvimento de diversas condições patológicas não é recente. A incidência de doenças como diverticulite, apendicite e câncer de cólon é reduzida em populações que ingeriam quantidades elevadas de frutas e hortaliças, quando comparadas às que ingeriam alimentos refinados (Burkitt 1969; Burkitt, Walker, e Painter 1974). Frutas e hortaliças são fontes de fibras que podem apresentar comportamentos distintos quanto à solubilidade. Fibras insolúveis, como a celulose e a lignina, são pouco fermentáveis, aumentam a massa fecal e reduzem o tempo de trânsito colônico das fezes. Por outro lado, fibras solúveis, como oligofrutose e a inulina são fermentadas por bactérias intestinais, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o acético, propiônico e butírico no cólon (Rose *et al.* 2007).

O ácido butírico é um AGCC, formado por quatro carbonos, obtido principalmente pela fermentação de fibras alimentares na microbiota gastrointestinal e pela digestão de dibutilglicerol e tributilglicerol, presentes na gordura do leite (Lai *et al.* 1997; Parodi 1997), muito embora também possa ser encontrado na saliva (Jeng *et al.* 2006). No cólon, esse AGCC constitui ainda a principal fonte de energia, sendo responsável pelo fornecimento de 70 a 90% da energia consumida pelo colonócito (Scheppach *et al.* 1992) e desempenhando, portanto, papel essencial no desenvolvimento normal desse órgão (Watkins *et al.* 1999).

O pronunciado potencial anticarcinogênico do ácido butírico foi observado em modelos de carcinogênese *in vitro* e *in vivo*, tais como próstata (Maier *et al.* 2000; Kuefer *et al.* 2004), mama (Coradini *et al.* 1997; Walker *et al.* 2001), estômago (Litvak *et al.* 2000) e, fígado (Velázquez *et al.* 1996). O ácido butírico ou seu sal, butirato de sódio em concentrações reduzidas apresenta a capacidade de induzir a diferenciação celular *in vitro*, devido as suas características estruturais e não por ação de seus metabólitos (Leder e Leder 1975). Nesse sentido, o ácido butírico tem sido considerado uma molécula com grande potencial quimioterapêutico (Prasad e Sinha 1976).

Tais observações motivaram o desenvolvimento de estudos farmacológico-clínicos com administração parenteral de NaBu a pacientes com leucemia aguda (Miller *et al.* 1987; Rephaeli *et al.* 1994), constatando-se remissão parcial em uma criança (Rephaeli

et al. 1994). Entretanto, a eficácia terapêutica do NaBu pode ser comprometida quando este não alcança concentrações plasmáticas ideais similares às observadas em estudos *in vitro* (0,5 mM) (Miller *et al.* 1987).

A administração intravenosa ou oral de ácido butírico e seus derivados não apresenta toxicidade digna de nota (Miller *et al.* 1987; Rephaeli *et al.* 1994). O ácido butírico obtido oralmente é rapidamente absorvido (Hamer *et al.* 2009) pelo intestino delgado ou grosso, com igual eficiência, em sua forma não dissociada por difusão simples pela membrana plasmática (Velázquez, Lederer, e Rombeau 1997) por contratransporte AGCC/HCO₃⁻ (McNeil, Cummings, e James 1978), ou ainda por transporte ativo das formas dissociadas. Entretanto, as concentrações efetivas de butirato no sangue são de difícil manutenção (Daniel *et al.* 1989), pois este é rapidamente metabolizado em corpos cetônicos, principalmente em 3-hidroxiacetil-CoA (Fitch e Fleming 1999), e ainda em butiril-CoA, enoil-CoA, L-hidroxiacetil-CoA, acetoacetil-CoA e acetil-CoA (Leschelle *et al.* 2000). Estudos de biodisponibilidade em roedores demonstraram que o ácido butírico apresenta meia vida plasmática inferior a 5 minutos quando administrado via intraperitoneal ou intravenosa. Em humanos, a meia vida do ácido butírico apresenta um comportamento bifásico em consequência de sua eliminação. Nos primeiros minutos o ácido butírico é depurado rapidamente, apresentando uma meia vida plasmática de apenas 30 segundos. Em seguida, supõe-se que a ligação do butirato a proteínas plasmáticas resulte em maior tempo de depuração, elevando a sua meia vida para 14 minutos (Daniel *et al.* 1989).

A meia-vida plasmática do butirato pode ser consideravelmente aumentada se este é fornecido na forma de seu pró-farmaco, a tributirina (Chen e Breitman 1994; Conley *et al.* 1998; Egorin *et al.* 1999). A tributirina é um triacilglicerol constituído por três moléculas de ácido butírico esterificadas com o glicerol; portanto, a hidrólise completa de 1 mol de tributirina pode gerar 3 moles de ácido butírico (Wang *et al.* 1994). Em ratos, identificou-se que após administração oral, a meia-vida plasmática da tributirina corresponde a aproximadamente 40 minutos (Zhao *et al.* 2006). Além disso, a administração de tributirina por via oral a roedores resulta em concentrações plasmáticas detectáveis de butirato logo após 5 min, atingindo seu valor máximo entre 15 e 60 minutos após o tratamento (Egorin *et al.* 1999) e pode ser mantida acima de 0,1 mM, por até 120 minutos (Egorin *et al.* 1999; Miyoshi *et al.* 2011). Camundongos

apresentaram concentrações plasmáticas de butirato entre 0,8 mM e 1 mM por até 1 hora após a administração de tributirina na dose de 7,75g/Kg. Além disso, a tributirina não apresentou efeitos tóxicos nesses animais tratados por via oral ou intraperitoneal quando administrada na dose de 8,2 g/Kg (Egorin *et al.* 1999).

A ingestão da tributirina via oral consiste em uma vantagem, pois além de propriedades farmacocinéticas mais favoráveis, esta apresenta mínima toxicidade (Edelman *et al.* 2003), é melhor tolerada quando comparada ao butirato (Egorin *et al.* 1999) e, ainda, é mais aceita pelos pacientes (Conley *et al.* 1998; Egorin *et al.* 1999). Assim, a tributirina tem se apresentado bastante promissora, e seu uso como aditivo em alimentos é aprovado em países como os Estados Unidos, Canadá e Brasil (Clarke, Feinman, e Harrison 2001; Li *et al.* 2009; Heidor *et al.* 2012).

1.2.1. Tributirina e quimioprevenção

O potencial anticarcinogênico da tributirina foi demonstrado em diversos estudos *in vitro*, e foi relacionado ao bloqueio da proliferação e indução da apoptose e diferenciação celular (Chen e Breitman 1994; Watkins *et al.* 1999; Maier *et al.* 2000; Clarke, Feinman, e Harrison 2001; Schröder e Maurer 2002; Kuefer *et al.* 2004). Em estudos *in vivo*, verificou-se a ação quimiopreventiva da tributirina em ratos submetidos a modelos experimentais de carcinogênese em cólon (Heidor *et al.* 2014) e em fígado (Kuroiwa-Trzmielina *et al.* 2009; de Conti *et al.* 2012).

O carcinoma hepatocelular (HCC) destaca-se como uma das neoplasias mais letais no mundo (Bray *et al.* 2012). O HCC é um câncer de mau prognóstico e sobrevida média de apenas 6 meses após o diagnóstico, sendo que somente 5% dos pacientes sobrevivem por mais de 5 anos. Além disso, os procedimentos cirúrgicos, como a ressecção, ou o transplante hepático estão disponíveis apenas para 30% dos pacientes (Hoshida *et al.* 2010). Dentre os fatores de risco associados ao desenvolvimento do HCC, os mais comuns são: os vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV); a ingestão crônica de etanol, o uso de tabaco, o consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas, o uso de contraceptivos orais e esteatohepatite não alcoólica (Marrero 2005; Bosch *et al.* 2005). Entretanto, os mecanismos moleculares e celulares da hepatocarcinogênese ainda não estão completamente esclarecidos (Pogribny, Rusyn, e Beland 2008).

A pesquisa de HCC em humanos é conduzida em pacientes que já desenvolveram a doença; limitando os estudos à neoplasia e mecanismos de progressão da doença. Por outro lado, modelos de hepatocarcinogênese em roedores são relevantes para o estudo de fatores etiológicos e mecanismos de desenvolvimento da neoplasia (Pogribny, Rusyn, e Beland 2008). Nesse sentido, o modelo do Hepatócito Resistente (RH) é um dos melhores modelos de hepatocarcinogênese descritos para experimentação *in vivo* (Toledo *et al.* 2003; Espíndola *et al.* 2005; Ong *et al.* 2006) e permitiu a avaliação da atividade quimiopreventiva da tributirina em estudos anteriores (Kuroiwa-Trzmielina *et al.* 2009; de Conti *et al.* 2012; de Conti *et al.* 2013).

O modelo do RH consiste na iniciação das células pelo agente iniciante dietilnitrosamina (DEN) e, promoção das células iniciadas por um agente promotor, 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), associados a um potente estímulo mitogênico representado por uma hepatectomia parcial a 70% (Solt e Farber 1976). Uma das vantagens do modelo é a produção de lesões preneoplásicas (LPN) e neoplásicas de forma rápida e sincronizada, que possibilitam a análise dos processos nas diferentes etapas da hepatocarcinogênese (Farber 1995). Além disso, é possível a distinção das poucas LPN persistentes (pLPN) das que sofrem remodelação (rLPN) (Rizzi *et al.* 1997). Aproximadamente 95% das LPN remodelam a partir de um processo complexo que envolve mudanças na estrutura celular e em suas características bioquímicas, retornando ao aspecto normal anterior do fígado. As pLPN adquirem a capacidade de crescimento autônomo e progridem para nódulos neoplásicos (nódulos displásicos ou adenomas) e HCC (Farber e Rubin 1991; Feo *et al.* 2000).

O tratamento com tributirina em fases preneoplásicas do modelo inibiu o desenvolvimento de pLPN e induziu o processo de remodelação em animais submetidos ao modelo RH. A atividade quimiopreventiva da tributirina foi atribuída à indução da apoptose e à modulação de processos epigenéticos especificamente em células presentes em LPN, sem efeitos deletérios em células normais (Kuroiwa-Trzmielina *et al.* 2009; de Conti *et al.* 2012). Assim, a utilização da tributirina como um agente quimiopreventivo pode ser considerada uma estratégia promissora no combate ao HCC.

1.3. Óleo de linhaça, fonte de ácido alfa-linolênico

1.3.1. Ácidos graxos poli-insaturados

A interação entre a genética e o meio ambiente fundamentam a saúde e a doença. Nesse sentido, fatores genéticos podem determinar susceptibilidade à doença e, fatores ambientais, entre eles a alimentação, determinam quais indivíduos geneticamente susceptíveis serão afetados (Simopoulos 2002). A nutrição é um fator ambiental de grande importância que sofreu grandes mudanças nos últimos 10.000 anos, a partir da revolução da agricultura. Após esse período os genes praticamente não sofreram modificações, uma vez que é estimada a ocorrência de 0,5% de mutações espontâneas no DNA a cada milhão de anos (Eaton e Konner 1985). Assim, vivemos em um ambiente nutricional diferente do qual fomos selecionados geneticamente, sendo as maiores mudanças representadas principalmente pela quantidade de ácidos graxos essenciais e antioxidantes presentes em nossa dieta (Eaton e Konner 1985; Simopoulos 2002). Nesse sentido, as rápidas mudanças em nossa dieta, assim como o estilo de vida sedentário e exposição a substâncias nocivas, representam potenciais promotores para doenças crônicas como aterosclerose, hipertensão, obesidade, e alguns cânceres (Simopoulos 2002).

Os seres humanos tornaram-se totalmente dependentes de grãos de cereais na maior parte de sua alimentação, o que tem grandes consequências para sua saúde. Grãos de cereais são ricos em carboidratos e ácidos graxos ômega-6, porém não ômega-3 e antioxidantes, quando comparados, por exemplo, com vegetais de folhas verdes (Simopoulos 2002).

Ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) são ácidos graxos que contêm mais de uma dupla ligação (Ratnayake e Galli 2009). Os ácidos alfa-linolênico (ALA, 18:3 n-3), eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3), docosapentaenóico (DPA, 22:5 n-3) e, docosahexanóico (DHA, 22:6 n-3) são ômega-3 importantes na nutrição humana. O ALA é o precursor da família ômega-3, sendo encontrado principalmente nos vegetais e, em altas concentrações no óleo de linhaça, *Linum usitatissimum* (Stephenson *et al.* 2013).

O organismo humano é incapaz de sintetizar ALA, nem mesmo ácido linoléico (AL, 18:2 n-6) o precursor da família ômega-6, sendo estes considerados, portanto, ácidos graxos essenciais (Ratnayake e Galli 2009). O ALA e AL são convertidos em suas respectivas famílias ômega-3 e 6 por uma série de reações independentes. Entretanto, são necessárias as mesmas enzimas para desaturação e alongação em ambas as vias, resultando em uma competição entre PUFA ômega-3 e 6 para sua conversão metabólica (Stephenson *et al.* 2013). O primeiro passo depende da enzima delta-6-desaturase, a qual tem maior afinidade por ALA. Por outro lado, o maior consumo de AL e, portanto, sua maior concentração favorece a maior conversão do PUFA ômega-6, produzindo predominantemente ácido araquidônico. Nesse sentido, a capacidade do metabolismo humano em obter EPA e DHA a partir da desaturação de ALA é insignificante em circunstâncias normais, sendo possível seu aumento pela maior ingestão de precursores ômega-3 (Stephenson *et al.* 2013) A interconversão entre ALA e AL não é possível, sendo assim são metabolicamente e funcionalmente distintos, apresentando inclusive funções fisiológicas opostas (Simopoulos 2002).

1.3.2. Óleo de linhaça e quimioprevenção

Doenças cardiovasculares, câncer, obesidade, doenças autoimunes, asma e depressão estão associadas à produção de tromboxano A₂, leucotrieno B₄, interleucinas 1 e 6, assim como fator de necrose tumoral e proteína C reativa. Estes fatores aumentam com o maior consumo de ácidos graxos ômega-6, e diminuem frente ao consumo de ômega-3, tanto ALA, como EPA e DHA (Simopoulos 2002).

As sementes e o óleo de linhaça estão presentes em alimentos como pães, biscoitos e misturas de cereais matinais. A semente contém grande quantidade de ALA, tendo demonstrado atividade quimiopreventiva em modelos experimentais de carcinogênese de próstata (Demark-Wahnefried *et al.* 2008) e de cólon (Bommareddy *et al.* 2009). O óleo de linhaça é constituído 53% por ALA e, reduziu a formação de criptas aberrantes em modelo de carcinogênese de cólon em ratos (Williams *et al.* 2007). Por outro lado, o óleo de milho, rico em ômega-6, utilizado como controle, foi relacionado à maior incidência e multiplicidade de criptas aberrantes, e maiores níveis de ácido araquidônico no cólon. A maior incorporação de ácido araquidônico às

membranas celulares do grupo óleo de milho sugerem maior proliferação celular (Dwivedi, Natarajan, e Matthees 2005).

1.4. Aspectos moleculares da carcinogênese e quimioprevenção

A carcinogênese, processo pelo qual se desenvolve a neoplasia, é descrita como um processo longo que envolve múltiplas etapas. A transformação das células normais em malignas requer cerca de metade a 2/3 da vida das diferentes espécies (Farber e Rubin 1991), ou de 20 a 40 anos, especialmente no caso de neoplasias sólidas em humanos (Loeb, Loeb, e Anderson 2003). O processo da carcinogênese envolve a proliferação celular independente do estímulo por fatores extra-celulares como hormônios, diferente da hiperplasia em que também ocorre um aumento no número de células, porém dependente de fatores estimulatórios (Bannasch 1986; Bannasch, Haertel, e Su 2003; Hanahan e Weinberg 2000; Hanahan e Weinberg 2011).

Apesar de a carcinogênese envolver a ocorrência de múltiplas etapas, destacam-se três estágios básicos, cada um com características morfológicas e moleculares distintas (**Figura 1**) (Pitot 2001). O primeiro estágio, chamado de iniciação, se dá pela ocorrência de uma mutação, causada por agentes de natureza física, biológica ou química (Young, Yang, e Colburn 2003). No caso da carcinogênese física, que pode ser induzida por radiação, a iniciação é consequência das ações diretas ou indiretas de fótons de elevada energia ou partículas sobre o DNA. Na carcinogênese biológica, o agente iniciante consiste de macromoléculas com peso molecular relativamente elevado, DNA ou RNA, responsáveis pela transmissão de informação; diferentemente da carcinogênese de origem química, que envolve moléculas de menor peso molecular em ação direta com o DNA celular, ou indireta, pelo seu metabólito ativo (Pitot e Dragan 1991; Pitot 1993).

Os carcinógenos químicos eletrofílicos, particularmente, podem reagir diretamente com o DNA (carcinógenos diretos), como por exemplo, o óxido de etileno ou derivados nitrogenados da mostarda. Em contrapartida, componentes quimicamente inertes ou nucleofílicos, como as aminas aromáticas e heterocíclicas, as N-nitrosaminas, entre outros, requerem conversão enzimática e são então chamados pró-carcinógenos (Luch

2005). Nesse caso, são necessárias enzimas de biotransformação, podendo-se destacar as do sistema citocromo P450. Essas reações muitas vezes ativam o carcinógeno, embora em alguns casos podem também resultar em sua inibição e incentivar sua excreção. Além disso, as enzimas não se encontram igualmente distribuídas no organismo, o que caracteriza a ação órgão-alvo de alguns carcinógenos (Luch 2005).

Entretanto, a formação de adutos de DNA por agentes que atuam por mecanismo genotóxicos não é suficiente para que ocorra a transformação maligna (Poirier 2004). A fixação do dano pela replicação do DNA, seguida de divisão celular converte o dano químico em alterações herdáveis denominadas mutações (Bertram 2000). Os sistemas de reparo celular são responsáveis pela eliminação dessas mutações, porém quando estas não são eliminadas podem originar no genoma transições, transversões e pequenas deleções (Pitot 2001). Nesse sentido, é essencial a ocorrência de um ciclo de proliferação celular para a fixação da mutação, o que caracteriza a iniciação como um estágio irreversível (Farber e Sarma 1987; Pitot 2001).

A próxima etapa após a iniciação, a promoção, é um estágio reversível caracterizado pela expansão clonal das células iniciadas em resposta ao estímulo contínuo de um agente promotor (Pitot 2001). Nesse caso, os agentes carcinógenos também podem atuar por mecanismo não-genotóxico, quando promovem alterações na expressão de genes envolvidos com a diferenciação e ciclo celular, inflamação e imunossupressão. Muitos carcinógenos não causam somente a iniciação, mas podem induzir todas as etapas do desenvolvimento neoplásico, e assim são chamados carcinógenos completos (Luch 2005). A dietilnitrosamina (DEN) e o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) são exemplos de carcinógenos químicos completos de ação indireta, bioativados no fígado principalmente pelas enzimas CYP2E1 e CYP1A2, respectivamente (Verna, Whysner, e Williams 1996a; Verna, Whysner, e Williams 1996b).

A progressão, última etapa da carcinogênese, é caracterizada pela instabilidade cariotípica e a contínua evolução de características independentes, tais como mudanças bioquímicas e estruturais nas células malignas, aumento na proliferação celular, invasão e metástase (Pitot 2001; Young, Yang, e Colburn 2003). Assim, uma

ou mais proliferações focais evoluem para uma neoplasia maligna (Farber e Sarma 1987; Clark 1991; Pitot 2001).

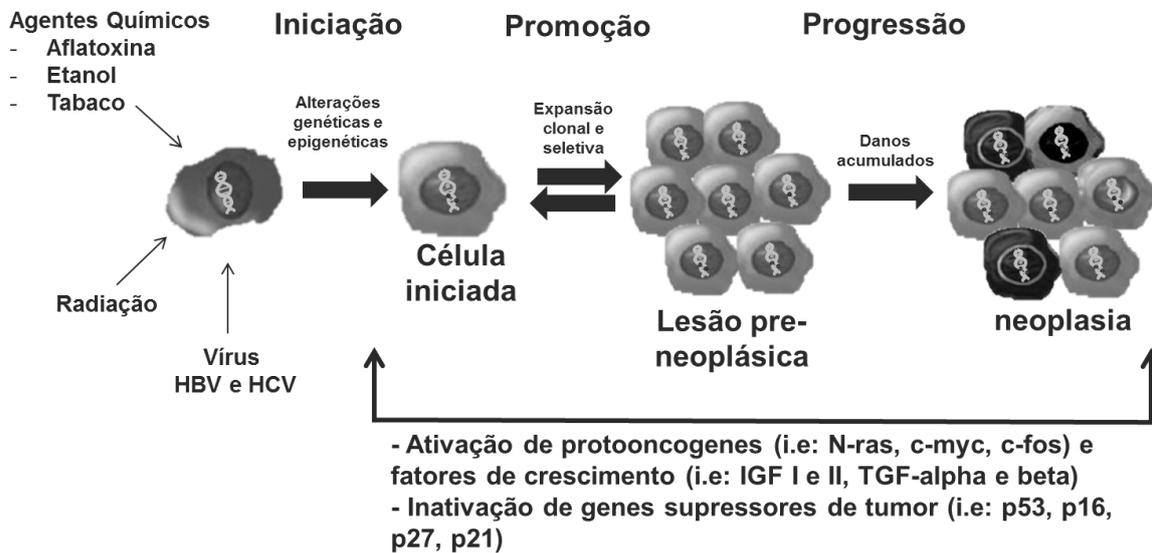


Figura 1: Os estágios básicos da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão. Durante a iniciação ocorrem alterações permanentes e irreversíveis no DNA da célula iniciada. Em contrapartida, não ocorrem mudanças moleculares na estrutura do DNA durante a promoção, por isso, é considerada uma etapa reversível. A progressão é o último estágio, caracterizado pela instabilidade cariotípica, é irreversível.

A evolução da carcinogênese em qualquer dos estágios (iniciação, promoção, progressão, e invasão) envolve a anormalidades na expressão gênica direcionada por modificações genéticas ou epigenéticas. A expressão de um gene é determinada pelo relaxamento da cromatina em regiões promotoras e, conseqüente acesso de fatores de transcrição. A mutação genética pode causar a perda, ganho funcional ou, ainda, a expressão anormal de genes supressores de tumor e/ou oncogenes. Por outro lado, alterações epigenéticas como a metilação do DNA e modificações de histonas determinam a estrutura da cromatina (**Figura 2-A e B**) (Sharma, Kelly, e Jones 2010). Modificações epigenéticas são herdáveis e, portanto, frequentemente observadas na carcinogênese. (Esteller e Herman 2002; Feinberg e Tycko 2004; Jones e Baylin 2007).

Um grande número de compostos bioativos (CBAs) apresentam atividade anticâncer relacionada à modulação de aspectos epigenéticos. Nesse sentido, reversão das modificações epigenéticas por compostos sintéticos e naturais é uma alternativa interessante no controle do câncer (Dashwood, Myzak, e Ho 2006) com grande potencial para a terapia clínica (**Figura 2-C**) (Ong *et al.* 2012).

1.4.2. Metilação do DNA

A metilação do DNA é catalisada pela família de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que adiciona grupo metila fornecido pela S-adenosil-metionina (SAM) no carbono 5 de citosinas presentes regiões de ilhas CpG. Estas regiões são constituídas por sequências repetitivas de citosinas e guaninas e, estão frequentemente associadas com sítios de início de transcrição gênica (Jones e Baylin 2007). A hipometilação genômica, ou seja, redução no número de citosinas metiladas ocorre em diversas neoplasias humanas. Este evento pode ser resultado da disponibilidade reduzida de SAM, integridade genômica comprometida, como no caso de presença de lesões não reparadas no DNA ou, ainda, expressão ou atividade alterada de DNMTs, como a DNMT1, principal enzima responsável pela metilação do DNA. A hipometilação genômica pode contribuir para com a carcinogênese por meio de diversos mecanismos, como a instabilidade cromossômica (Eden *et al.* 2003) e a indução da expressão de oncogenes (Calvisi *et al.* 2007).

Outro evento epigenético presente na carcinogênese que envolve a transferência de grupos metila é o silenciamento de genes supressores de tumor por hipermetilação. Entretanto, a metilação do DNA não suprime diretamente a transcrição gênica. O estado funcional do gene depende da constituição da cromatina ao redor do gene promotor (**Figura 2**) (Huang *et al.* 2011).

1.4.2. Modificações em histonas

A cromatina é composta por unidades básicas de repetição denominadas nucleossomos, as quais são formados por DNA octâmeros de proteínas histonas em torno dos quais o DNA permanece enrolado. As histonas são constituídas principalmente por um domínio que se exterioriza do nucleossomo, a região amino-terminal; e um domínio carboxi-terminal (Turner 2005). A região amino-terminal das histonas pode sofrer diversas modificações pós-transcricionais tais como acetilação, ubiquitinação e metilação dos resíduos de lisina (k); fosforilação de resíduos de serina (S) e treonina e metilação de resíduos de arginina (Fischle, Wang, e Allis 2003).

A acetilação, modificação mais estudada em histonas, neutraliza a carga positiva dos resíduos de lisina, diminuindo a afinidade das histonas pelo DNA, que possui carga negativa. Assim, ocorre o desprendimento da terminação da histona do nucleossomo, afrouxando a estrutura da cromatina, e permitindo o acesso de fatores de transcrição (**Figura 2-A**) (Grunstein 1997). Nesse sentido, a acetilação de histonas, que pode apresentar-se hiperacetilada em todos os resíduos de lisina, está associada à ativação da transcrição, e então, à eucromatina. Por outro lado, a cromatina encontra-se condensada quando os genes promotores estão metilados e as histonas não acetiladas (Huang *et al.* 2011). A regulação do estado de acetilação das histonas é comandada pelas enzimas acetilases (HAT) e desacetilases de histonas (HDAC) (Davie 2003). Assim, enzimas responsáveis pela acetilação, HATs, e desacetilação, HDACs, de histonas constituem proteínas estimuladoras e repressoras da transcrição, respectivamente (Füllgrabe, Kavanagh, e Joseph 2011).

Além da acetilação, a metilação de histonas H3 no resíduo de lisina 4 também está associada a ativação da transcrição de genes. Por outro lado, a metilação em histonas H3 nos resíduos de lisina 9 e 27 está frequentemente associada à regiões promotoras de genes silenciados (Jones e Baylin 2007). Além disso, a região promotora de genes silenciados por hipermetilação é ocupada por diversas proteínas como, por exemplo, as que apresentam o domínio de ligação às ilhotas CpGs metiladas (MBDs). O maquinário enzimático que estabelece o silenciamento da transcrição gênica é recrutado por MBDs (**Figura 2-B**) (Huang *et al.* 2011). A MeCP2 é um dos cinco membros da família de proteínas MBD e, exerce sua atividade repressora da transcrição gênica por meio do recrutamento de HDAC e metiltransferases de histonas (HMT). Dessa forma, um dos mecanismos de silenciamento de genes supressores de tumor é exercido pela ligação do MeCP2 à região promotora destes (Hamidi, Singh, e Chen 2015).

1.4.3. Acetilação de proteínas não histonas

A acetilação e a desacetilação são modificações pós-traducionais que ocorrem tanto em histonas quanto em outros tipos de proteínas. Recentemente, um número crescente de proteínas não histonas têm sido identificados como alvos de acetilação. A acetilação reversível de proteínas não histonas pode modular funções de proteínas por

alterar sua estabilidade, localização celular e interações com outras proteínas ou nucleotídeos (Singh *et al.* 2010).

Fatores celulares importantes como a p53, NF- κ B, p65, CBP, p300, STAT3, tubulin, PC4, fatores GATA, receptores nucleares, fator induzível de hypoxia (HIF)-1 α , FoxO1, proteínas de choque térmico (Hsp)-90, HMG, E2F, MyoD, Bcr–Abl, the FLT3 kinase, c-Raf kinase dentre outras são alvos de acetilação. Assim, vários dos alvos de acetilação são produtos de oncogenes e supressores de tumor e estão diretamente envolvidos com a tumorigenese, progressão de tumor e metástase (Yang e Seto 2008; Roy *et al.* 2005; Yamaguchi *et al.* 2009).

A proteína p53 é considerada um importante regulador da apoptose em resposta a diversos estímulos (Haupt *et al.* 2003). A acetilação deste fator de transcrição em resíduos de lisina presentes na carboxila terminal aumenta sua interação com o DNA, sua estabilidade e atividade transcricional associada à interrupção do ciclo celular e apoptose (Zhao *et al.* 2006). A ativação de p53, induzida por HDACis por exemplo, resulta na ativação da transcrição de vários genes reguladores do ciclo celular e apoptose como *p21*, *BAX*, *DR5*, e *PUMA*, assim como o silenciamento transcricional de proteínas antiapoptóticas, como BCL-2 e MCL-1 (Yamaguchi *et al.* 2009).

A presença da p53 no núcleo da célula é essencial a sua função, sendo influenciada por diferentes mecanismos de controle da translocação núcleo-citoplasma que incluem fatores relacionados à importação e exportação nuclear da p53, sua localização subnuclear, fixação e sequestro citoplasmático (Kuroiwa-Trzmielina *et al.* 2009; Stommel *et al.* 1999). O acúmulo citoplasmático da p53 está relacionado ao aumento na instabilidade genômica em fases iniciais da hepatocarcinogênese, que além de sustentar a expansão clonal, também pode promover modificações genéticas que direcionam a transformação maligna (Van Gijssel 2000). Além disso, a proteína p53 tem papel importante na regulação da autofagia celular e sua localização citoplasmática suprime este processo (de Conti *et al.* 2013). O acúmulo de p53 no núcleo das células pode ocorrer pela maior importação desta proteína (Marchenko *et al.* 2010). Muito embora, pouco se conheça a respeito de mecanismos, a importação nuclear da p53 ocorre por sua interação no citoplasma com importinas, que são reguladas positivamente por acetilação (Bannister *et al.* 2000).

Assim, a normalização da expressão de genes essenciais para o controle do crescimento e morte celular, assim como alterações nos estados de acetilação de proteínas não histonas são abordagens interessantes para a quimioprevenção.

1.4.4. Modulação de eventos epigenéticos

O butirato foi o primeiro composto natural a ser identificado com atividade inibitória de HDAC. Esse AGCC atua como ligante fraco de HDAC inibindo enzimas das classes 1 e 2 e promovendo a acetilação de histonas, levando à expressão, dessa forma, de genes envolvidos com a diferenciação celular e apoptose (Davie 2003; Roy *et al.* 2005; Dashwood, Myzak, e Ho 2006). A inibição da atividade de HDAC *in vitro* ocorre em concentrações de micro à milimolares, níveis possíveis de serem obtidos no trato gastrointestinal, onde o butirato é a principal fonte de energia para os colonócitos (McNeil, Cummings, e James 1978). Recentemente foi demonstrado que animais submetidos ao modelo do RH e tratados com a tributirina em fases preneoplásicas apresentaram aumento de apoptose em LPN e da expressão de p21, assim como a maior acetilação de histonas e de p53 (Kuroiwa-Trzmielina *et al.* 2009; de Conti *et al.* 2012; de Conti *et al.* 2013). Assim, pró-fármacos de ácido butírico, como a tributirina, também atuam como HDACi.

O tratamento de células de neuroblastoma com 10mM de DHA por 48h demonstrou o aumento da acetilação de histonas H3k9 e menor atividade de HDACs 1, 2 e 3 (Sadli *et al.* 2012). DHA também diminuiu a metilação de histonas H3k4, H3k9, H3k27, H3k36 e H3k79, assim como aumentou a expressão de *Bcl-2*. Assim, o tratamento com DHA parece induzir modificações em histonas relacionadas à ativação transcricional e modificações na expressão gênica que resultam em redução na apoptose. Embora os mecanismos de ação pelos quais ácidos graxos atuam no epigenoma não sejam bem esclarecidos, sugere-se que a variação do consumo energético possa modular a atividade de HDACs (Burdge e Lillycrop, 2014).

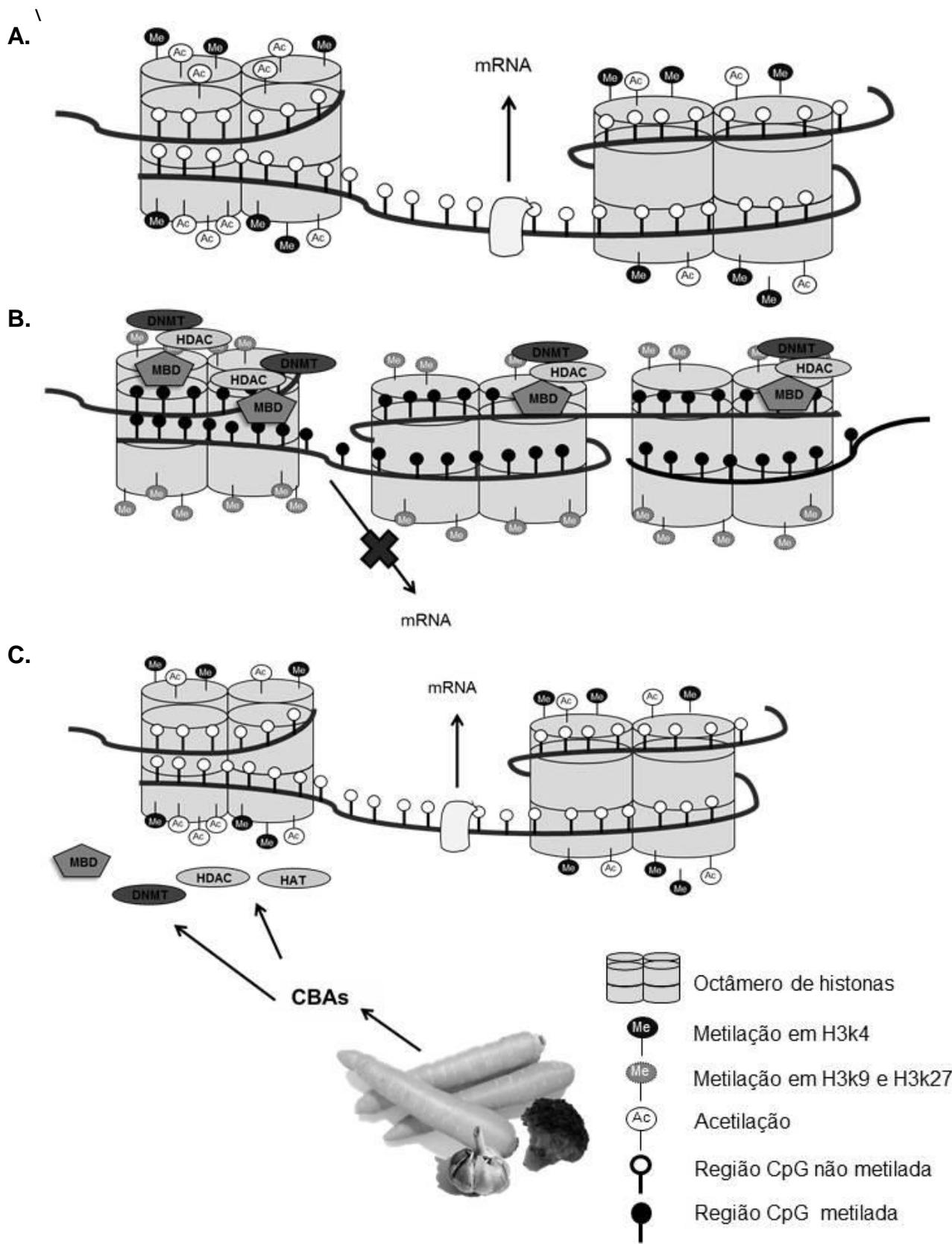


Figura 2: Alterações epigenéticas relacionadas à carcinogênese e sua modulação por CBAs. **(A)** Transcrição ativa. Os promotores de genes ativos transcritos apresentam hipometilação de regiões CpG, acetilação de histonas e metilação de

histonas H3 no resíduo de lisina 4 (H3k4 me3). **(B)** Transcrição inativa. Durante a carcinogênese, regiões promotoras de genes supressores de tumor apresentam-se, frequentemente, hipermetiladas. O silenciamento transcricional é mediado por MBDs, que se ligam às regiões CpGs metiladas e recrutam HDACs e DNMTs. Além disso, a metilação dos resíduos 9 e 27 de histonas H3 (H3k9me3 e H3k27me3) também está associada à inativação de genes. **(C)** Compostos bioativos de alimentos podem modular a atividade de DNMT, HDAC e MBD, e aumentar a acetilação de histonas e a metilação em H3k4 de regiões promotoras de genes inativos. Assim, a cromatina poderia se tornar mais acessível a fatores de transcrição.

Em estudo recente, a hipermetilação de histona H3 nos resíduos 9 e 27 foi observada em fígados preneoplásicos de animais tratados com lipídios estruturados produzidos pela interesterificação enzimática de tributirina e óleo de linhaça durante a fase de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese experimental. Além disso, a modulação de aspectos epigenéticos pelo novo composto resultaria na menor expressão dos oncogenes *myc*, *Ccnd1* e *Stat3* (Heidor *et al.* 2015).

1.5. Lipídios estruturados e a quimioprevenção

O primeiro estudo clínico com a tributirina teve o objetivo de estabelecer efeitos tóxicos e terapêuticos, assim como as doses que resultam em concentrações séricas efetivas de butirato (0,5-3 mM) e sua manutenção (Conley *et al.* 1998). Para tanto, 13 pacientes com diferentes tipos de câncer receberam capsulas gelatinosas de tributirina em uma única dose diária que variava entre 50 e 400mg/Kg de peso corpóreo. Os pacientes não apresentaram nenhum sinal significativo de toxicidade e, foi obtida a concentração sérica de 0,45mM, próxima à concentração de butirato utilizada em estudos *in vitro*, a dose de 200mg/Kg de tributirina. Entretanto, uma única dose de tributirina não foi suficiente para a manutenção das concentrações séricas de ácido butírico necessárias para sua atividade terapêutica. Assim, foi sugerida a dose de 200mg/Kg de tributirina três vezes ao dia (Conley *et al.*, 1998).

Em estudo clínico subsequente (Eldeman *et al.*, 2003), não foram observados efeitos tóxicos relevantes em 20 pacientes, também com diferentes tipos de cânceres, que receberam cápsulas gelatinosas de tributirina na dosagem de 200mg/Kg três vezes ao dia. Embora indivíduos com peso médio de 70Kg recebessem 28 cápsulas gelatinosas por refeição, a adesão ao tratamento não foi reduzida. O tratamento se

estendeu por vários meses estabilizando a doença em diversos pacientes (Edelman et al., 2003). A concentração plasmática média de butirato nesses indivíduos foi maior do que aquela de pacientes leucêmicos que receberam butirato de sódio por via intravenosa (Miller et al., 1987; Edelman et al., 2003). Entretanto, foram observadas variações significativas na concentração sérica de butirato entre os indivíduos que receberam as cápsulas de tributirina, as quais poderiam estar relacionadas à variações metabólicas individuais ou a uma instabilidade inerente ao pró-fármaco (Conley et al., 1998; Edelman et al., 2003). Nesse sentido, várias estratégias diferentes têm sido pesquisadas visando aumentar a biodisponibilidade da tributirina.

A administração de uma emulsão lipídica de tributirina a ratos aumentou em até quatro vezes a biodisponibilidade de butirato e/ou tributirina em comparação à administração da tributirina em sua forma pura (Su, 2006). Essa emulsão foi sintetizada com frações sintéticas de LDL, que apresentam comportamento cinético no plasma similar às LDL nativas, com capacidade de ligação a receptores de LDL e incorporação intracelular (Maranhão et al., 1993). Assim, o desenvolvimento de emulsão de tributirina com esta propriedade apresenta o potencial de atuar em células neoplásicas que expressam receptores de LDL em grande quantidade e, ainda, o de induzir a apoptose em células transformadas de cólon e de fígado (Su, 2006).

A solubilidade e biodisponibilidade intravenosa da tributirina é melhorada quando emulsionada com ácido retinóico. Esse tipo de emulsão liga-se a apolipoproteínas e, portanto, apresenta maior AUC (área sob a curva) devido à menor eliminação do ácido all-trans retinóico (ATRA). Além disso, a emulsão de tributirina e ATRA apresentou maior efeito sobre a inibição da proliferação celular em relação ao observado com o ATRA, em células Caco-2 e HepG2 (Su et al., 2007). A combinação de retinóides com HDACi têm sido avaliada em estudos pré-clínicos e clínicos (Heidor et al., 2012). Em estudos *in vivo*, a administração da tributirina em combinação com a vitamina A apresentou efeitos inibitórios em LPN, induziu a acetilação de histonas e restaurou a expressão de p21. Além disso, a associação induziu a apoptose nessas LPN de forma mais pronunciada do que a administração de tributirina isoladamente (de Conti et al., 2011). A reativação epigenética de genes envolvidos no metabolismo de retinóides e que se encontram silenciados em diversos tipos de lesões pré-neoplásicas e

neoplásicas pode eventualmente explicar a sinergia desses compostos e sua utilização em estratégias de controle do câncer.

A combinação de butirato de sódio com ácido fólico inibiu o desenvolvimento do câncer de cólon em modelo induzido por DMH em camundongos (Lu *et al.*, 2008). Em modelo de hepatocarcinogênese experimental, a associação da tributirina com o ácido fólico apresentou maior efeito quimiopreventivo em comparação aos compostos isoladamente (Guariento *et al.*, 2014). Os efeitos inibitórios observados com a associação foram atribuídos à modulação de aspectos epigenéticos, incluindo a metilação do DNA e modificações pós-traducionais de histonas (Lu *et al.*, 2008), e à inibição da angiogênese em fases iniciais da hepatocarcinogênese (Guariento *et al.*, 2014).

Nesse sentido, a combinação de agentes quimiopreventivos com diferentes mecanismos de ação tem sido considerada uma alternativa promissora para a prevenção do câncer (Heidor *et al.*, 2015). Avanços biotecnológicos possibilitam a modificação de biomoléculas e, portanto, o desenvolvimento de alimentos e fármacos destinados à manutenção do estado fisiológico normal e a prevenção de doenças como o câncer (Heidor *et al.* 2012). Nesse caso, as propriedades nutricionais, físico-químicas e organolépticas de uma mistura lipídica também podem ser alteradas através da reestruturação ou modificação da composição e/ou distribuição posicional de ácidos graxos nas moléculas de triacilglicerol (Stein, 1999; Silva *et al.*, 2009). A interesterificação química ou enzimática é uma boa estratégia para a síntese de óleos e gorduras com propriedades físicas e funcionais desejáveis para sua aplicação em alimentos (Osborn e Akoh, 2002).

A interesterificação química é um processo barato e de fácil realização em escala industrial. Entretanto, a reação é pouco específica e não permite controlar a distribuição posicional de ácidos graxos no produto final. Esse tipo de reação é catalisada por metais em condições anidras e alta temperatura e, gera resíduos de difícil eliminação. Por outro lado, as reações catalisadas por lipases oferecem grande seletividade e regioespecificidade que permitem o controle da distribuição posicional de ácidos graxos no produto final e menor geração de resíduos (Osborn e Akoh, 2002). Lipases 1,3 específicas possibilitam a síntese de novos triacilgliceróis com AGCC e AGCL na

mesma molécula de glicerol, denominados lipídios estruturados. Os lipídios estruturados são considerados uma nova geração de substâncias com propriedades nutricionais e funcionais melhoradas (Stein, 1999; Silva et al., 2009; Heidor, *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, pró-fármacos do ácido butírico têm sido sintetizados a fim de aumentar sua biodisponibilidade *in vivo*. Triacilgliceróis estruturados são apresentados como veículos potenciais para o butirato na estrutura de acilgliceróis. (Martín *et al.* 2011). Lipases pancreáticas atuam predominantemente nas posições *sn-1* e *sn-3* das ligações éster de triacilgliceróis, liberando ácidos graxos livres e 2-monoacilgliceróis que são preferencialmente absorvidos em ratos (Stein 1999). Além disso, acilgliceróis são componentes de membrana e moléculas de sinalização relacionados à propriedades anticâncer e diferenciação celular (Martín *et al.* 2011).

Estudos mais antigos demonstraram, ainda, que uma emulsão contendo lipídios estruturados de AGCC nas posições *sn-1* e *sn-3* com AGCL na posição *sn-2* apresentou maior meia vida em ratos quando comparada a uma emulsão contendo apenas AGCC (Hedeman *et al.* 1996). Dessa forma, é possível que lipídios estruturados compostos por ácido butírico e ALA modulem favoravelmente a absorção das moléculas presentes no triacilglicerol e, assim, poderiam ter papel importante na quimioprevenção da hepatocarcinogênese. Assim, a síntese de lipídios estruturados obtidos pela interesterificação de tributirina e óleo de linhaça pode ser útil para a prevenção, inibição ou reversão das etapas iniciais da carcinogênese (Heidor *et al.* 2012). Vale ressaltar que a elucidação da atividade quimiopreventiva de compostos em modelos experimentais com animais é essencial para que se prossiga com ensaios clínicos (Sporn e Suh 2002). Nesse sentido, a busca de mecanismos que expliquem a influência dos alimentos no câncer contribui para esclarecer aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, além de promover um grande impacto em estratégias de prevenção (Ames, Gold, e Willett 1995; De Flora e Ferguson 2005).

Assim, aventou-se que os lipídios estruturados obtidos por interesterificação enzimática apresentem vantagens quimiopreventivas em relação a tributirina quando administrada isoladamente durante a fase de promoção inicial do modelo do hepatócito

resistente. Além disso, a modulação de aspectos epigenéticos e da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor podem estar envolvidos com a atividade quimiopreventiva observada.

2. Objetivo

Avaliar o potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados produzidos por interesterificação enzimática da tributirina com óleo de linhaça quando administrados durante a fase de promoção inicial da hepatocarcinogênese experimental em ratos.

3. Material e métodos

3.1. Síntese e caracterização de lipídios estruturados

3.1.1. Síntese dos lipídios estruturados

Os lipídios estruturados foram preparados a partir de uma mistura de tributirina (tributirina 97%; Aldrich, EUA) e óleo de linhaça (óleo de Linhaça Extra-Virgem; Vital Âtman, Brasil) na proporção 1,35:1,0 (massa:massa) ou 2,5:1,0 (mol:mol) de tributirina:ALA. A mistura foi interesterificada em um reator tubular de vidro contendo 70g da lipase 1,3 específica de *Thermomyces lanuginosa* imobilizada em sílica (LipozymeTL IM, Novozymes, Brasil). Inicialmente, óleo de soja foi introduzido no reator com fluxo de 1mL/min para a remoção de umidade e bolhas de ar da enzima. Após a temperatura do reator atingir 60°C, a mistura de tributirina com óleo de linhaça foi bombeada para o mesmo com fluxo de 1mL/min (tempo de residência de 1h). Para evitar possíveis contaminações com os ácidos graxos do óleo de soja, foram descartados os primeiros 200 mL do produto interesterificado (Silva *et al.* 2012, Heidor *et al.* 2015). A síntese e caracterização dos lipídios estruturados foram realizadas no Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, com o auxílio do Prof. Luis Antônio Gioielli e da Profa. Juliana N. R. Ract.

3.1.2. Comportamento térmico: Calorimetria de fusão e cristalização

As análises calorimétricas do comportamento de fusão e cristalização dos lipídios estruturados ou de seus componentes foram realizadas em analisador térmico (modelo DSC 4000, Perkin-Elmer, EUA) (Silva *et al.* 2009). Assim, as amostras fundidas (5 mg) foram acondicionadas em recipientes de 50 μ L e lacrados hermeticamente. As amostras foram mantidas à 80°C por 10 minutos e, em seguida, resfriadas até -60°C na razão de -10°C/min e mantidas nesta temperatura por 30 min para a determinação das curvas de cristalização. As curvas de fusão foram determinadas pelo aquecimento das amostras de -60 a 80°C na razão de 5°C/min. A análise dos dados foi realizada pelo software *Pyris* (EUA).

3.1.3. Composição em triacilgliceróis

As amostras foram dissolvidas em acetona (5 mg/L) e analisadas diretamente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando o sistema Shimadzu Prominence 20A (Shimadzu Corporation, Japão) equipado com um detector de chama ionizada Shimadzu ELSD-LTII e duas colunas Supelcosil™ C18 (25 cm×4.6 mm×5 μ m) (Sigma-Aldrich, EUA)(Segura *et al.* 2011, Heidor *et al.* 2015). As análises foram iniciadas com a vazão de 1 mL/min de uma mistura de acetona/acetonitrila (1:1) com gradiente crescente de clorofórmio que atingiu 20% em 60 minutos. Em seguida, a composição de solvente foi mantida por 20 minutos e, retornou a inicial aos 85 minutos. Os picos foram identificados usando padrões de triacilgliceróis puros, e a ordem de eluição foi relacionada ao número de carbonos equivalentes. As análises foram realizadas em duplicatas.

3.2. Ensaio *in vivo*

3.2.1. Protocolo Experimental

Foram utilizados 66 ratos machos Wistar, recém-desmamados, pesando inicialmente entre 80-90 g e obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF/IQ-USP). Os

animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (4 ratos/gaiola) com tampas de aço inoxidável contendo maravalha esterilizada. Água e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Brasil) foram oferecidas *ad libitum* durante todo o experimento. O peso corpóreo dos animais foi acompanhado diariamente. O ensaio biológico 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 (Protocolo CEUA-FCF/USP 336), em ambiente apropriado para condução de estudos de carcinogênese, à temperatura de $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 h.

Após o período de aclimação de uma semana todos os animais foram submetidos ao modelo do hepatócito resistente (sigla em inglês, RH), de acordo com Semple-Roberts (1987), com exceção de 5 ratos do grupo NI (grupo não submetido ao protocolo experimental). A iniciação ocorreu pela administração intraperitoneal de dietilnitrosamina (DEN; Sigma, EUA, 200 mg/Kg de peso corporal, p.c) dissolvida em solução de NaCl a 0,9%. Após um período de recuperação de 2 semanas os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses únicas em dias consecutivos, por gavagem, de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF; Sigma, EUA; 20 mg/Kg de p.c./dia) dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho. Vinte e quatro horas após a última aplicação de 2-AAF os animais foram submetidos à um potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial (HP) a 70%. Os animais receberam por gavagem duas doses adicionais de 2-AAF (7,5 e 20 mg/Kg p.c.) no segundo e quarto dias subsequentes à HP, respectivamente.

Os animais submetidos ao modelo do RH foram distribuídos de forma aleatória em cinco grupos experimentais 3 dias após a última dose de 2-AAF, quando foram iniciados os tratamentos:

Grupo Controle (CO): animais submetidos ao modelo do RH que receberam diariamente maltodextrina (Nestlé, Brasil; 3,0 g/Kg p.c/dia) como controle isocalórico (6 Kcal/g) por gavagem.

Grupo Óleo de Linhaça (LIN): animais submetidos ao modelo do RH que receberam diariamente óleo de linhaça (1,33 g/Kg p.c/dia) por gavagem.

Grupo Tributirina (TB): animais submetidos ao modelo do RH que receberam diariamente tributirina (2,0 g/Kg p.c/dia) por gavagem.

Grupo Mistura (MIS): animais submetidos ao modelo do RH que receberam diariamente uma mistura contendo a mesma proporção molar (2,5:1) de tributirina e óleo de linhaça utilizada na obtenção dos lipídios estruturados, porém não submetida à reação de interesterificação enzimática (1,65g/Kg p.c/dia) por gavagem.

Grupo Estruturado (EST): animais submetidos ao modelo do RH que receberam diariamente uma solução de lipídios obtidos pela interesterificação enzimática da tributirina com óleo de linhaça (1,65g/Kg p.c/dia) por gavagem.

As doses das substâncias administradas foram calculadas para fornecerem a mesma quantidade energética da tributirina (Kuroiwa-Trzmielina *et al.* 2009, Heidor *et al.*2015). As substâncias foram administradas diariamente durante cinco semanas, a partir de uma semana após a realização da HP (**Figura 3**).

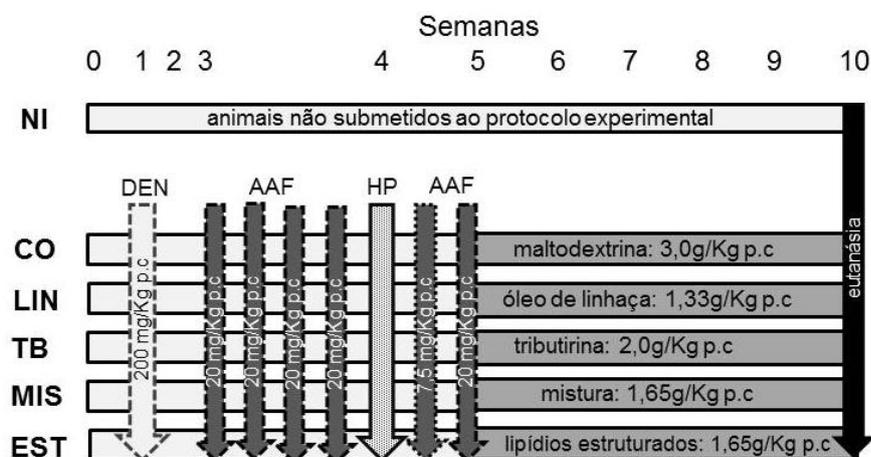


Figura 3: Desenho experimental. Os animais foram submetidos ao modelo do hepatócito resistente. Os hepatócitos foram iniciados por meio de administração intraperitoneal de DEN em solução salina (NaCl a 0,9%). Após 2 semanas, os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses únicas em dias consecutivos, por gavagem, de 2-AAF dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho (20mg/Kg p.c), seguida de uma hepatectomia parcial (HP) a 70%. Os animais receberam duas doses adicionais de 2-AAF (7,5 e 20mg/Kg p.c) no segundo e quarto dias subsequentes à HP, respectivamente. Os tratamentos diários foram iniciados 3 dias após a última dose de 2-AAF.

Eutanásia dos animais

Na ocasião da eutanásia, os animais permaneceram em jejum durante seis horas e foram pesados antes do procedimento. Em seguida, os mesmos foram submetidos à anestesia inalatória com éter etílico (Merck, Alemanha). Após entrarem em plano anestésico foram posicionados em decúbito dorsal horizontal, realizando-se a laparotomia. A eutanásia deu-se por meio de secção da aorta abdominal e consequente choque hipovolêmico. Por fim, retirou-se o fígado, o qual foi lavado em solução salina gelada a 0,9% e pesado em balança eletrônica digital, seguindo-se, então, o exame macroscópico do mesmo.

3.2.2. Análise macroscópica

O fígado de cada animal foi examinado individualmente quanto à presença, em sua superfície, de formações nodulares de tamanhos variados e coloração esbranquiçada, que se distinguiam do parênquima hepático. Essas formações denominadas LPN, foram classificadas pelo seu diâmetro em maior que 1 mm ou menor que 1mm. Após o exame da superfície, cada lobo foi seccionado em fatias de aproximadamente 0,3 cm de espessura, sendo então, identificadas e contadas as lesões nodulares internas (Kuroiwa-Trzmielina *et al.* 2009).

Posteriormente, foram colhidas amostras de cada lobo hepático dos animais para análise morfométrica de LPN, apoptose e proliferação celular. Estes fragmentos de fígado foram imediatamente fixados em formalina tamponada a 4% por 24 horas. Os lobos hepáticos foram separados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e em seguida, armazenados em “freezer” a -80°C (Revco, EUA).

3.3. Dupla marcação imunoistoquímica

O número e a porcentagem de área ocupada pelas lesões preneoplásicas e suas características de persistência ou remodelação, assim como proliferação celular foram avaliadas em corte histológico por dupla marcação imunoistoquímica para GST-P e PCNA (de Conti, *et al.* 2012). Após desparafinização e rehidratação, cortes de fígado com 5µm foram tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em PBS durante 20

minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas mergulhando-se as lâminas em solução a 3% de leite em pó desnatado em tampão fosfato (PBS: NaCl 137mM; Na₂HPO₄ 10mM; KCl 2,68mM; KH₂PO₄ 1,76 mM e água ultra-pura, pH 7,40) durante 1 hora. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-PCNA (Dako, Dinamarca) na diluição de 1:200 em albumina sérica bovina a 1% (BSA 1%) em câmara úmida a 4°C durante 16 horas, tratadas com anticorpo secundário biotilado universal (anti-mouse/coelho) por 30 minutos e, posteriormente, com o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos (LSAB+System-HPR, Dako, Dinamarca). Após a lavagem das lâminas, foi realizada a revelação pela diaminobenzidina (DAB, Sigma, EUA) por 1 minuto. As lâminas, então, foram mantidas em água por 5 minutos, tratadas com Levamisole (Dako, Dinamarca) para bloqueio da fosfatase alcalina endógena, incubadas com anti-GST-P (MBL, Japão) 1:1000 em BSA 1% por 1 hora a temperatura ambiente seguido de tratamento com sistema de polímero (Dako Cytomation EnVision, Dinamarca) durante 45 minutos e revelação com *permanent red* (Dako, Dinamarca). A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 3 minutos seguida de diferenciação com água amoniacal e montagem das lâminas em resina aquosa *faramount aqueous* (DAKO, Dinamarca). Entre todas as etapas foi realizada lavagem dos cortes em PBS. A especificidade das marcações foi controlada subtraindo-se o anticorpo primário e substituindo-o por solução de BSA 1%.

Análise morfométrica de lesões preneoplásicas GSTP+

O número (n/cm²), tamanho médio (mm²) e porcentagem de área do corte ocupada por LPNs GST-P positivas, persistentes (**Apêndice 1-A**) ou em remodelação (**Apêndice 1-B**) (de Conti *et al.* 2012), bem como a área total dos fragmentos hepáticos foram determinados utilizando-se o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carls Zeiss, Alemanha). Este recurso permite que a área de cada corte histológico do fígado, assim como de cada lesão GST-P positiva, seja medida por um sistema de mosaico.

Análise da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pela contagem de núcleos PCNA positivos em fase S (fortemente corados) (**Apêndice 1-C**) (Furtado *et al.*, 2014) entre 2000

hepatócitos analisados no tecido ao redor das lesões (*surrounding*) e dentro das LPN (persistente ou em remodelação) em objetiva de 20x. Para tanto, foi utilizado o microscópio óptico (Axio Imager M2; Carls Zeiss; Alemanha). Os dados foram expressos em índice de proliferação celular (%).

3.4. Análise de apoptose

Os hepatócitos em apoptose (**Apêndice 1-D**) foram quantificados em corte histológico pelo método de H&E (Levin *et al.* 1999) utilizando-se microscópio óptico (Axio Imager M2; Carls Zeiss; Alemanha). Todos os hepatócitos em apoptose foram contados entre 2000 hepatócitos analisados no tecido ao redor das lesões (*surrounding*) e dentro das LPN (persistente ou em remodelação) em objetiva de 20x. Os dados foram expressos em índice apoptótico (%).

3.5. Determinação das concentrações dos ácidos butírico e alfa-linolênico

A análise das concentrações hepáticas de ácido butírico foi realizada de acordo com Kuroiwa-Trzmielina e colaboradores (2009). Amostras congeladas de fígado foram homogeneizadas com solução 50 mM de PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto – inibidor de protease) e acetonitrila, além do padrão interno éster etilbutírico (Sigma, EUA). A quantificação do ácido butírico foi feita em cromatógrafo gasoso HP6890 (Agilent, Palo Alto, California) equipado com coluna CP Wax 58- FFAP (25 m × 0.32 m × 0.2 μm), acoplado a espectrofotômetro de massas HP5973 (Agilent, EUA).

A extração de ácidos graxos foi realizada de acordo com Folch, 1957, com a adição do padrão interno de linolenato de etila (Sigma, EUA). A quantificação do ácido alfa-linolênico foi feita em cromatógrafo gasoso HP6890 (Agilent, EUA) equipado com coluna Supelco SPB-50 (30m x 0.25mm ID, 0.25μm), acoplado a espectrofotômetro de massas HP5973 (Agilent, EUA).

As determinações das concentrações hepáticas dos ácidos butírico e alfa-linolênico foram realizadas no laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos, com o auxílio do Prof. Eduardo Purgatto.

3.6. Western Blot

As histonas foram extraídas de amostras de fígado dos animais em solução ácida. As proteínas totais e frações nuclear e citoplasmática de fígado de ratos foram extraídas de acordo com protocolos específicos descritos anteriormente (de Conti *et al.* 2013). Após sua quantificação, as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Então, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, poro 0,2um, EUA). O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com ECL Prime (Amersham Biosciences, Suécia) por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada com tampão PBS-T (NaCl 137 Mm; Na₂HPO₄ 10 Mm; KCl 2,68 Mm; KH₂PO₄ 1,76 Mm e Tween 1% em água) e incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína em diluições pré-determinadas overnight. Após a incubação das membranas com anticorpo primário específico (**Apêndice 2**), foi realizada a reação com o anticorpo secundário correspondente. As proteínas β -actina e a histona H1 foram utilizadas como controles constitutivos. A detecção das bandas de proteínas deu-se por quimioluminescência com o conjunto de reagentes específico (ECL Advanced, GE Healthcare, Suécia). A intensidade das bandas foi quantificada por densitômetro (Modelo GS-700 Imaging Densitometer, BIO-RAD, EUA) com software específico (Molecular Analyst, BIO-RAD, EUA).

3.7. Análise da expressão gênica por real time-PCR

(Real Time Polymerase Chain Reaction)

O RNA do tecido hepático total foi extraído de acordo com especificações do kit illustra RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare, EUA). O RNA quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop 1000, ThermoScientific, EUA) foi convertido em cDNA de acordo com o kit *SuperScriptTM First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, EUA) a partir de 100 ng de RNA. A quantificação da expressão de mRNA dos genes *Rassf1* (Rn01445298_m1), *Rassf5* (Rn00571287_m1) e *Cav-1* (Rn00755834_m1) através de seus respectivos cDNAs, foi realizada por PCR em tempo real utilizando-se o sistema de amplificação TaqMan (Applied Biosystems, EUA). O gene *Gapdh* foi utilizado como controle. A reação de PCR foi realizada no Sistema de PCR em Tempo Real Step One

Plus HT (Life Technologies, EUA), tendo sido utilizados as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 1 min.

3.8. Análise de expressão gênica por real time-PCR arrays

O RNA total dos grupos NI, CO, TB e EST (n=4 por grupo) foi extraído de amostras de fígado com o *RNeasy Mini kit* (Qiagen, Valencia, CA) seguindo as orientações do fabricante. O DNA complementar foi sintetizado a partir de 5 µg de RNA total utilizando-se o *RT2 First Strand cDNA synthesis kit* (Qiagen). A expressão de 84 genes relacionados a vias de desenvolvimento de câncer de fígado foi analisada por PCR em tempo real empregando o *RT2 Profiler PCR Array - Liver Cancer Pathways genes*. O protocolo foi realizado de acordo com as orientações do fabricante (Qiagen). Os níveis relativos de RNA mensageiro para cada gene foi determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen e Livak 2008). Um gene foi considerado diferencialmente expresso quando $p < 0,05$ e a razão $> 1,5$.

3.9. Análise estatística

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown-Forsythe). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, ou frequência; e todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GRAPHPAD PRISM (Graphpad, EUA) e adotando-se nível de significância de 0,05. Resultados paramétricos foram analisados pelo teste de Análise de Variâncias (ANOVA) seguido do teste de Tukey. A análise de resultados não-paramétricos foram realizados segundo testes de Wilcoxon. No caso de análises de incidência foi utilizado o teste exato de Fisher.

4. Resultados

4.1. Caracterização dos lipídios estruturados

4.1.1. Comportamento térmico

A reestruturação ou modificação da composição e/ou distribuição posicional de ácidos graxos nas moléculas de glicerol pode alterar as propriedades físico-químicas de uma mistura lipídica; portanto, avaliou-se o comportamento térmico dos óleos.

A **Tabela 1** apresenta os picos, assim como seu início e fim, obtidos a partir das curvas de cristalização e fusão (**Figuras 4-A e B**), respectivamente. O óleo de linhaça apresentou dois picos de cristalização. O primeiro pico ocorreu à temperatura de $-7,5^{\circ}\text{C}$, iniciado em $-4,6^{\circ}\text{C}$ e finalizado em $-14,4^{\circ}\text{C}$. O segundo pico de cristalização ocorreu à $-53,8^{\circ}\text{C}$, com início em $-52,1^{\circ}\text{C}$ e fim em $-55,5^{\circ}\text{C}$. Durante a fusão, foi observado um pico principal em $-24,9^{\circ}\text{C}$, com início em $-28,4^{\circ}\text{C}$ e fim em $-21,7^{\circ}\text{C}$, com outros três picos secundários parcialmente sobrepostos a ele. A tributirina não apresentou quaisquer eventos de cristalização ou de fusão na faixa de temperatura em que foi analisada, entre -60 e 80°C . A mistura de tributirina ao óleo de linhaça apresentou apenas um pico de cristalização à temperatura de $-10,4^{\circ}\text{C}$, com início em $-7,2^{\circ}\text{C}$ e fim em $-17,5^{\circ}\text{C}$. O pico de fusão da mistura não esterificada ocorreu em $-33,3^{\circ}\text{C}$, com início em $-36,9^{\circ}\text{C}$ e fim em $-29,7^{\circ}\text{C}$. Após a interesterificação, os lipídios estruturados não apresentaram picos de cristalização e fusão na faixa de temperatura estudada.

Tabela 1. Resultados obtidos a partir das curvas de cristalização e fusão do óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de tributirina com óleo de linhaça (MIS) ou lipídios estruturados (EST).

	Cristalização 1			
	LIN	TB	MIS	EST
Início (°C)	-4,6 ± 0,2	-	-7,2 ± 0,1	-
Fim (°C)	-14,4 ± 2,1	-	-17,5 ± 0,2	-
Pico (°C)	-7,5 ± 0,4	-	-10,4 ± 0,0	-
	Cristalização 2			
Início (°C)	-52,1 ± 0,4	-	-	-
Fim (°C)	-55,5 ± 0,5	-	-	-
Pico (°C)	-53,8 ± 0,5	-	-	-
	Fusão			
Início (°C)	-28,4 ± 0,0	-	-36,9 ± 0,1	-
Fim (°C)	-21,7 ± 0,0	-	-29,7 ± 0,0	-
Pico (°C)	-24,9 ± 0,0	-	-33,3 ± 0,1	-

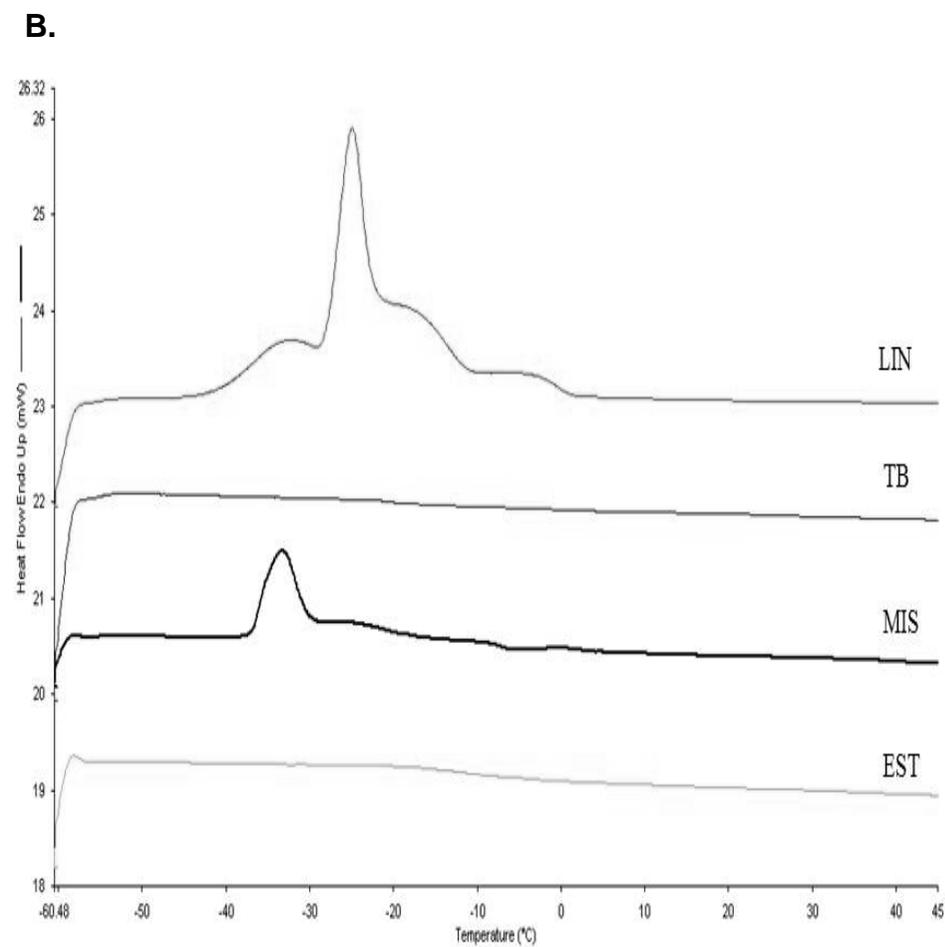
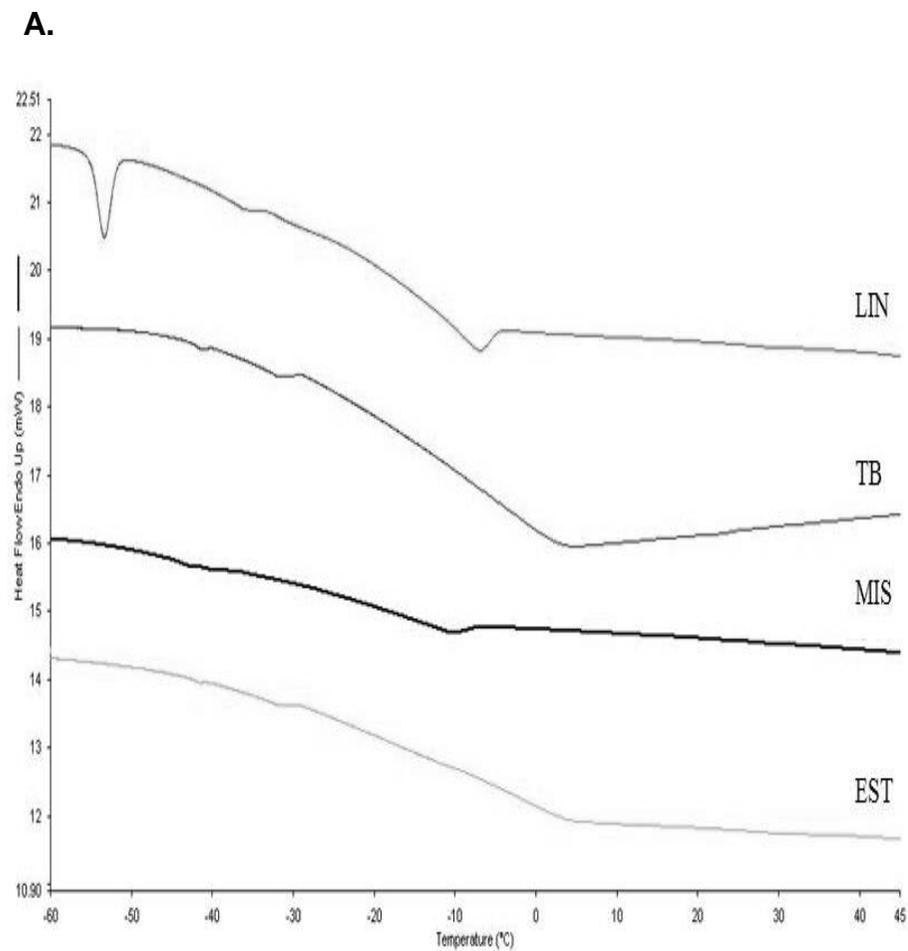


Figura 4: Curvas de cristalização **(A)** e fusão **(B)** do óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de TB com LIN (MIS) ou lipídios estruturados (EST).

4.1.2. Composição em triacilgliceróis

A **Figura 5** representa a composição em triacilgliceróis do óleo de linhaça, tributirina e lipídios estruturados. Os triacilgliceróis mais abundantes no óleo de linhaça foram LnLnLn [Ln = 18:3(n-3)], LLLn [L = 18:2(n-6)], LLnLn, OLL (O = 18:1), OLLn, LLL e OLnLn. Como esperado, tributirina apresentou somente BBB (B = 4:0). Novos triacilgliceróis foram sintetizados após a interesterificação. Os 3 butiratos que estavam presentes inicialmente na tributirina foram redistribuídos com os ácidos graxos provenientes do óleo de linhaça, para formar novos triacilgliceróis como BBLn, BBL, BBO, BLnLn, BLLn e BOLn. Aproximadamente 82% dos triacilgliceróis presentes nos lipídios estruturados apresentaram 2 ácidos butíricos em sua estrutura, conforme planejado.

4.2. Ensaio *in vivo*

4.2.1. Peso corpóreo e hepático dos animais

A evolução do peso corpóreo dos animais foi avaliada a fim de verificar a aplicação adequada do modelo do RH, bem como observar possíveis efeitos tóxicos dos tratamentos. A **Figura 6** apresenta os dados de evolução de peso corpóreo dos animais durante o período experimental. Nota-se que, as maiores perdas de peso ocorreram durante os períodos de administração da DEN, de 2-AAF e do procedimento de HP a 70% nos grupos submetidos ao modelo do RH (CO, LIN, MIS, TB, EST) em relação ao grupo NI ($p < 0,05$; **Figura 6**). Em geral, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos em relação aos parâmetros de peso corpóreo inicial ou final e, peso hepático relativo (**Tabela 2**). Os pesos iniciais semelhantes entre os grupos experimentais apontam para a aleatorização adequada dos animais.

A mortalidade de cerca de 20% dos animais dos grupos submetidos ao modelo ocorreu somente nas 2 semanas que se sucederam à HP, período crítico observado em outros experimentos conduzidos no laboratório com o modelo do RH (Espíndola *et al.* 2005; Fonseca 2005; Ong *et al.* 2006). Os animais apresentavam debilidade e apatia, acompanhadas da perda de peso e redução no consumo de ração progressivos prévios ao óbito. À necropsia, os fígados de alguns animais apresentavam-se

atrofiados e com tonalidade clara, indicando possível insuficiência hepática decorrente da não regeneração adequada do órgão após a HP.

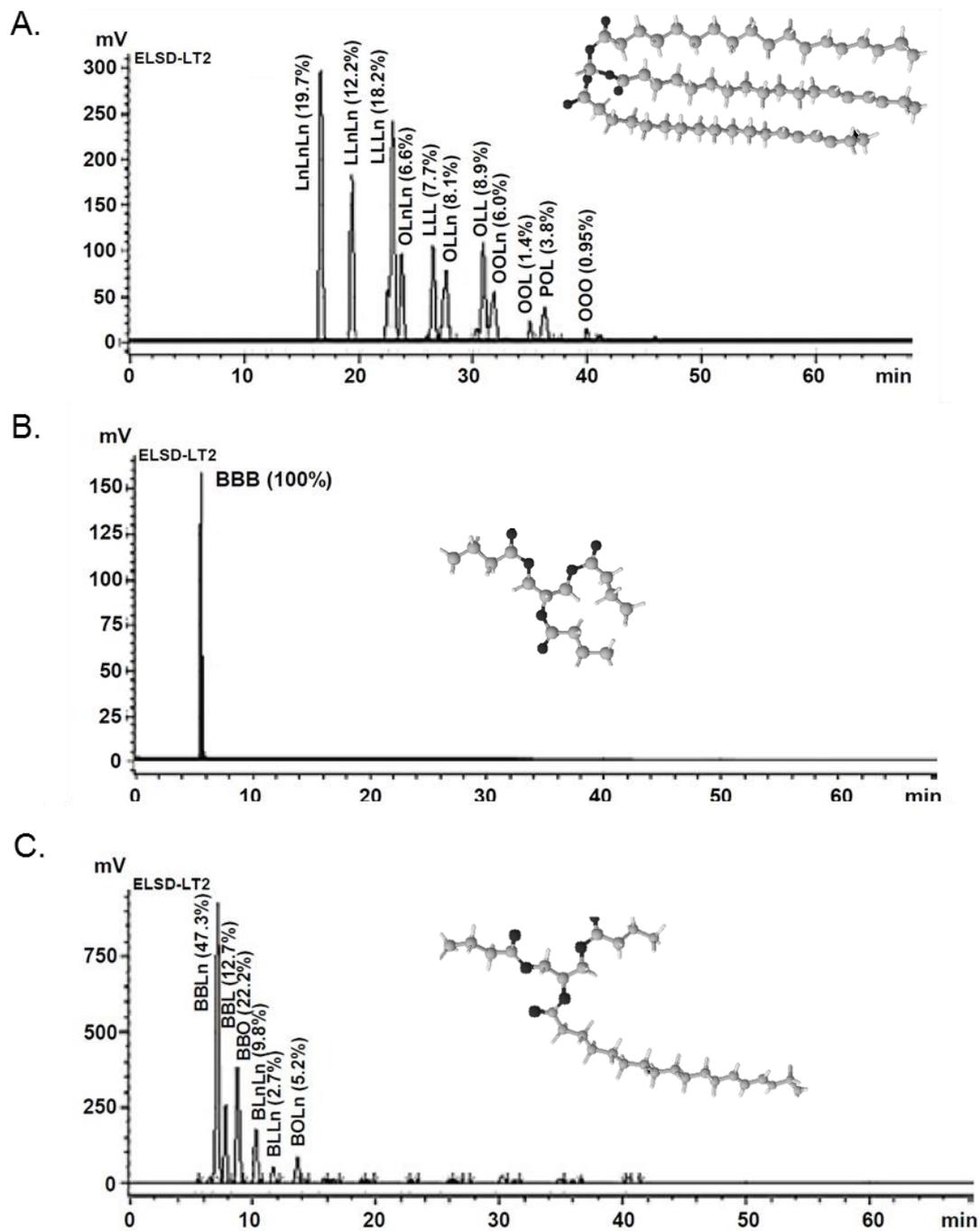


Figura 5 : Composição em triacilgliceróis do óleo de linhaça **(A)**, tributirina **(B)** e lipídios estruturados **(C)**.

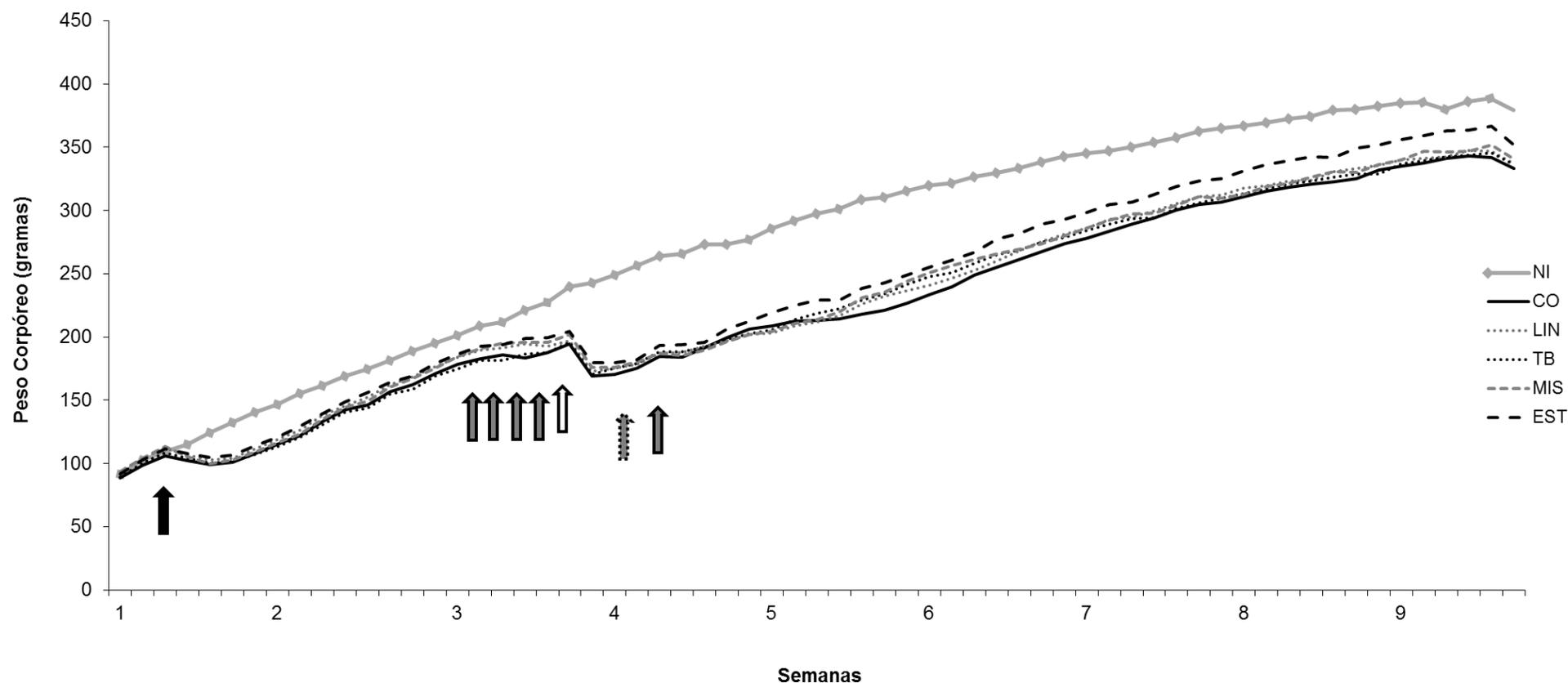


Figura 6: Representação gráfica do controle de peso dos animais não submetidos ao modelo experimental (NI), ou submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de tributirina com óleo de linhaça (MIS) ou lipídios estruturados (EST) durante a etapa de promoção inicial da hepatocarcinogênese. Legenda: ↑ Administração de dietilnitrosamina (DEN – 200mg/kg p.c); ↑ ↓ Administração do agente promotor 2-acetilaminofluoreno (AAF - 20mg/Kg p.c e 7,5 mg/Kg p.c, respectivamente); ↑ Hepatectomia parcial 70%.

4.2.2. Análise macroscópica do fígado de animais submetidos ao protocolo experimental

Por ocasião da eutanásia, os fígados foram analisados macroscopicamente para detecção de nódulos visíveis (**Anexo 3**), que foram também classificados quanto ao tamanho, tanto na superfície hepática, como ao corte de 3 mm de espessura. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na incidência de nódulos visíveis, porém os grupos TB e EST apresentaram menor ($p<0,05$) multiplicidade de nódulos em relação ao grupo CO (**Tabela 2**). Além disso, os grupos TB e EST apresentaram maior ($p<0,05$) porcentagem de nódulos menores do que 1mm e menor ($p<0,05$) porcentagem de nódulos maiores do que 1mm em relação ao grupo CO. Resultado similar ($p<0,05$) foi observado no grupo MIS, apesar de sua multiplicidade não ter sido diferente ($p>0,05$) em comparação ao grupo CO. Não foram observadas diferenças significantes ($p>0,05$) na multiplicidade ou tamanho de nódulos do grupo LIN em quando foi comparado ao grupo CO.

4.2.3. Análise morfométrica de lesões preneoplásicas GSTP+

Os grupos tratados com tributirina e com lipídios estruturados apresentaram menor ($p<0,05$) número de LPN, tanto persistentes como em remodelação, em relação ao grupo que recebeu maltodextrina. Entretanto, apenas o grupo TB apresentou menor ($p<0,05$) tamanho médio das LPN quando comparado ao grupo CO . A porcentagem de área do corte ocupada por pLPN e rLPN, nos grupos TB e EST foi menor ($p<0,05$) quando comparada a do grupo CO (**Tabela 3**). Os grupos LIN e MIS não apresentaram diferença significativa estatisticamente ($p>0,05$) em relação ao número e % de área do corte ocupada por LPN comparada ao grupo CO.

Tabela 2: Pesos corpóreo e hepático relativo de animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de tributirina e óleo de linhaça (MIS) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção inicial da hepatocarcinogênese, assim como sua incidência e porcentagem por tamanho de LPN hepáticas visíveis à macroscopia observadas por ocasião da eutanásia.

Grupos (n)	Peso Corpóreo Inicial (g)	Peso Corpóreo Final (g)	Peso Hepático Relativo (%)	Incidência de nódulos (%)	Multipli- cidade	% de nódulos macroscópicos	
						<1mm	>1mm
CO (11)	88,6±9,5	333,1 ±29,7	4,0 ±0,7	100	56 ±43	50	50
LIN (10)	93,7±13,1	336,8 ±24,3	4,0 ±0,9	90	48 ±57	52	48
TB (8)	89,3±9,0	338,4 ±19,1	3,3 ±0,3	75	6 ±26 ^a	94 ^a	6 ^a
MIS (7)	93,4±12,7	344,0 ±30,6	3,7 ±0,4	86	21 ±21	68 ^a	32 ^a
EST (11)	91,8±9,2	351,6 ±26,5	3,8 ±0,6	82	19 ±21 ^a	61 ^a	39 ^a

Dados apresentados na forma de média ± erro padrão da média. ^a Diferença em relação ao grupo CO, $p < 0,05$, segundo teste Exato de Fischer.

Não houve diferença ($p > 0,05$) quanto ao índice de proliferação celular (%) em pLPN, rLPN entre os grupos estudados. O *surrounding* (tecido ao redor da lesão) de todos os grupos apresentou menor ($p < 0,05$) proliferação celular quando comparado à pLPN e rLPN do mesmo grupo experimental, porém não apresentou diferenças ($p > 0,05$) de proliferação entre os grupos experimentais (**Tabela 3**). Por outro lado, observou-se que tanto o grupo TB, quanto o grupo EST apresentaram maior ($p < 0,05$) índice apoptótico (%) nas rLPN em relação ao grupo CO. De modo interessante, o índice apoptótico do grupo EST foi menor ($p < 0,05$) em comparação ao do grupo TB. Não foram observadas diferenças no índice apoptótico dos grupos LIN e MIS em pLPN ou rLPN, em relação ao grupo CO. Apenas o grupo TB apresentou aumento ($p < 0,05$) do índice apoptótico em rLPN em relação a pLPN.

Todos os grupos apresentaram maior ($p < 0,05$) índice apoptótico em rLPN em relação ao *surrounding* (tecido ao redor da lesão) do mesmo grupo. Não houve diferenças significativas estatisticamente ($p > 0,05$) quanto a apoptose em pLPN em nenhum grupo experimental (**Tabela 3**).

4.2.4. Concentrações hepáticas de ácido butírico e ácido alfa-linolênico

O grupo TB, como esperado, apresentou maior ($p < 0,05$) concentração hepática de ácido butírico, em relação aos grupos CO e LIN. Embora não tenham apresentado diferenças significantes ($p = 0,06$), os grupos MIS e EST apresentaram maior concentração hepática de ácido butírico quando comparados ao grupo CO. O grupo tratado com lipídios estruturados apresentou menor ($p < 0,05$) concentração de ácido butírico em relação ao tributirina. Os grupos MIS e EST apresentaram maior ($p < 0,05$) concentração hepática de ácido butírico do que o grupo LIN. A concentração hepática de ácido butírico no grupo LIN não foi diferente ($p > 0,05$) do grupo CO (**Figura 7-A**). Observou-se que o grupo LIN, como esperado, apresentou maiores ($p < 0,05$) concentrações de ALA em relação ao grupo CO e, o mesmo ocorreu para os grupos MIS e EST ($p < 0,05$). Os grupos MIS e EST apresentaram concentrações significativamente menores ($p < 0,05$) que os grupos LIN e TB. O grupo TB apresentou concentrações de ácido alfa-linolênico inferiores ($p < 0,05$) às do grupo LIN, mas similares ($p > 0,05$) às do grupo grupo CO (**Figura 7-B**).

Tabela 3: Análise morfométrica de lesões preneoplásicas GSTP⁺ e índices de proliferação celular e apoptose em animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de tributirina e óleo de linhaça (MIS) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Grupo (n)	Número LPN GST-P ⁺ / cm ²		Tamanho Médio de LPN GST-P ⁺ (mm ²)		% de área ocupada por LPN GST-P ⁺		Índice de Proliferação (%) em LPN			Índice Apoptótico (%) em LPN		
	pLPN	rLPN	pLPN	rLPN	pLPN	rLPN	Sur	pLPN	rLPN	Sur	pLPN	rLPN
	CO (11)	14±5	37±7	0,87±0,51	0,53±0,26	11±5	18±7	2,6±0,1	6,7±0,5 ^d	4,8±0,3 ^d	0,04±0,02	0,1±0,03 ^d
LIN (10)	15±5	38±10	0,79±0,68	0,55±0,42	11±8	18±11	1,8±0,1	6,4±0,3 ^d	4,5±0,3 ^d	0,05±0,02	0,09±0,02 ^d	0,13±0,01 ^d
TB(8)	4±3 ^a	27±8 ^a	0,34±0,34 ^a	0,24±0,12 ^a	2±3 ^a	8±6 ^a	1,4±0,2	5,5±0,6 ^d	4,4±0,3 ^d	0,08±0,03	0,2±0,04 ^d	0,44±0,06 ^{a,c,d}
MIS (7)	10±2	37±10	0,40±0,22	0,31±0,15	5±3	12±6	1,9±0,2	5,6±0,9 ^d	4,1±0,5 ^d	0,05±0,04	0,14±0,08 ^d	0,19±0,1 ^d
EST (11)	8±5 ^a	26±9 ^a	0,51±0,35	0,47±0,38	4±3 ^a	10±7 ^a	1,7±0,1	5,9±0,4 ^d	4,2±0,3 ^d	0,06±0,02	0,18±0,01 ^d	0,28±0,03 ^{a,b,d}

Dados expressos na forma de média ± erro padrão da média; Diferença ^{a,b} em relação ao grupo CO e TB, respectivamente, ^c diferença em relação apenas à pLPN do mesmo grupo, ^d diferença em relação ao *surrounding* (tecido ao redor da lesão) do mesmo grupo; segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey, p<0,05. *Sur* (*surrounding*), pLPN= lesões preneoplásicas persistentes, rLPN=lesões preneoplásicas em remodelação.

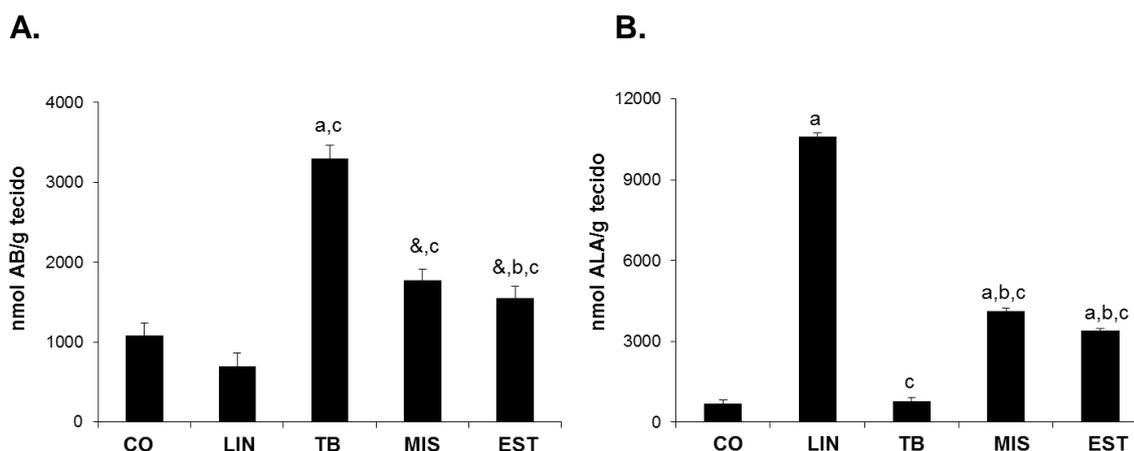


Figura 7: (A) Concentração hepática de ácido butírico (AB) e **(B)** ácido alfa-linolênico (ALA) em ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura de tributirina com óleo de linhaça (MIS) ou lipídios estruturados (EST) durante a etapa de promoção inicial da hepatocarcinogênese. ^{a,b,c}: diferença em relação ao grupo CO, TB e LIN, respectivamente ($p < 0,05$); & comparação em relação ao grupo CO ($p = 0,06$). Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Dados expressos na forma de média \pm erro padrão da média ($n = 5$).

4.3. Alvos epigenéticos

Alterações epigenéticas são alvos interessantes para a quimioprevenção por serem potencialmente reversíveis e representarem um nível adicional na regulação da transcrição gênica (Santos-Rosa e Caldas 2005). Nesse contexto, foram avaliadas no presente estudo modificações de histonas e a expressão de proteínas relacionadas às alterações epigenéticas.

O aumento ($p < 0,05$) da acetilação no resíduo de K9 de histonas H3 (H3k9ac), em comparação ao grupo CO, foi observado apenas em fígados de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com tributirina. Além disso, observou-se menor ($p < 0,05$) acetilação de histonas no grupo EST em relação ao grupo TB (**Figura 8-A**). Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais quanto à trimetilação nos resíduos k4, k9 e k27 de histonas H3 (H3k4me3, H3k9me3 e H3k27me3, respectivamente) (**Figuras 8-B, C e D**).

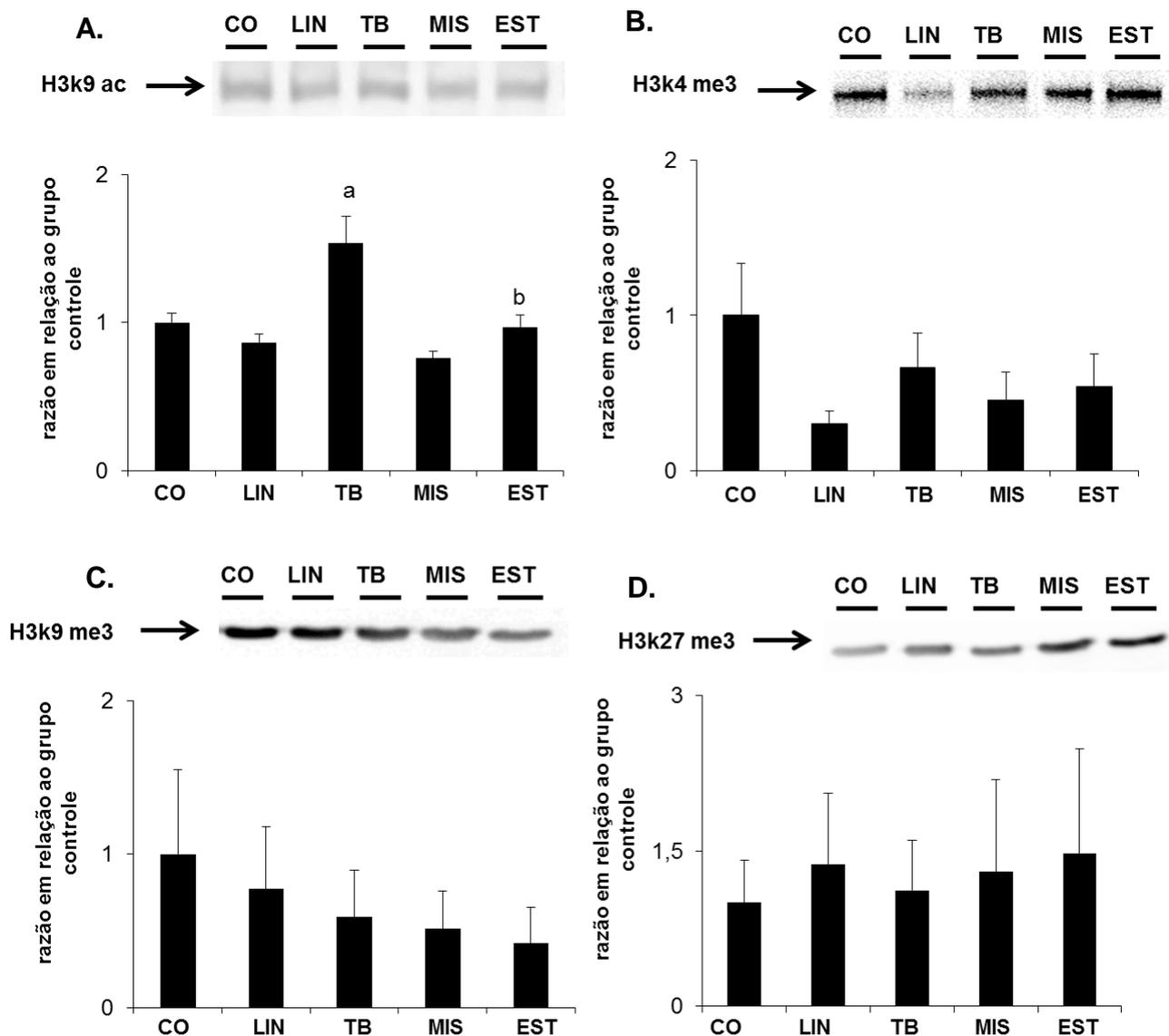


Figura 8: Modificações de histonas em fígados preneoplásicos. **(A)** H3K9 ac e, **(B)** H3K4me3 **(C)** H3K9me3 **(D)** H3K27me3. A análise foi realizada com histonas extraídas de fígado de ratos Wistar não submetidos ao modelo experimental (NI) ou submetidos ao modelo RH e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura simples de óleo de linhaça e tributirina (MIS), ou lipídios estruturados obtidos a partir da esterificação do óleo de linhaça e tributirina (EST). Imagens representativas dos *immunoblots* são apresentadas. Os resultados expressos são proporcionais à expressão da histona no grupo CO. Diferença ^{a,b} em relação aos grupos CO e TB, respectivamente, segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey, $p < 0,05$. Dados expressos na forma de média \pm erro padrão da média ($n=5$).

A hiperacetilação das histonas resultante da inibição de sítios específicos das enzimas desacetilases de histonas (HDAC) pode resultar na ativação transcricional de genes como o p21^{cip/waf} (Davie, 2003) e aumento da acetilação de outras

proteínas além de histonas (Singh *et al.* 2010). No presente estudo, o grupo TB apresentou aumento, embora não significativo ($p>0,05$), na concentração total de p21 em relação ao grupo CO, correspondente ao aumento da acetilação de histonas H3. Não foram observadas diferenças significantes ($p>0,05$) entre os demais grupos experimentais quanto aos níveis da proteína p21 (**Figura 9-A**). A acetilação de proteínas não histonas desempenha um papel importante em sua localização e degradação, assim como na interação proteína-proteína e proteína-DNA (Singh *et al.* 2010). Apesar de não ter sido avaliada aqui, a acetilação da proteína p53 é uma modificação epigenética induzida pela tributirina importante para sua função e localização celular (de Conti *et al.* 2013). A quantificação de p53 total não apresentou diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos experimentais (**Figura 9-B**). A compartimentalização da proteína p53 dentro da célula pode ser representada por sua razão nuclear/citoplasmática. (**Figura 9-C**). Nesse sentido, animais tratados com tributirina e óleo de linhaça apresentaram maior ($p<0,05$) razão nuclear/citoplasmática e, portanto, maior concentração de p53 nuclear em comparação aos animais tratados com maltodextrina (CO). Não foram observadas diferenças significantes ($p>0,05$) quanto à razão nuclear/citoplasmática de p53 nos grupos MIS e EST em relação ao grupo CO. Por outro lado, os animais tratados com a mistura não esterificada ou com lipídios estruturado apresentaram menor ($p<0,05$) razão nuclear/citoplasmática de p53 em comparação aos tratados com tributirina (**Figura 9-C**).

A compartimentalização celular de p53 envolve sua interação com proteínas de translocação nuclear como, por exemplo, a importina-alfa (Marchenko *et al.* 2010). No presente estudo, o grupo TB apresentou concentração total de importina-alfa aumentada ($p<0,05$) em comparação ao grupo CO. Animais tratados com lipídios estruturados apresentaram concentração reduzida ($p<0,05$) de importina-alfa em comparação aos tratados com tributirina, sem diferença estatística ($p>0,05$) em relação aos animais controles (**Figura 9-D**). Os grupos LIN e MIS não apresentaram diferenças significantes estatisticamente ($p>0,05$) em relação ao grupo CO ou TB.

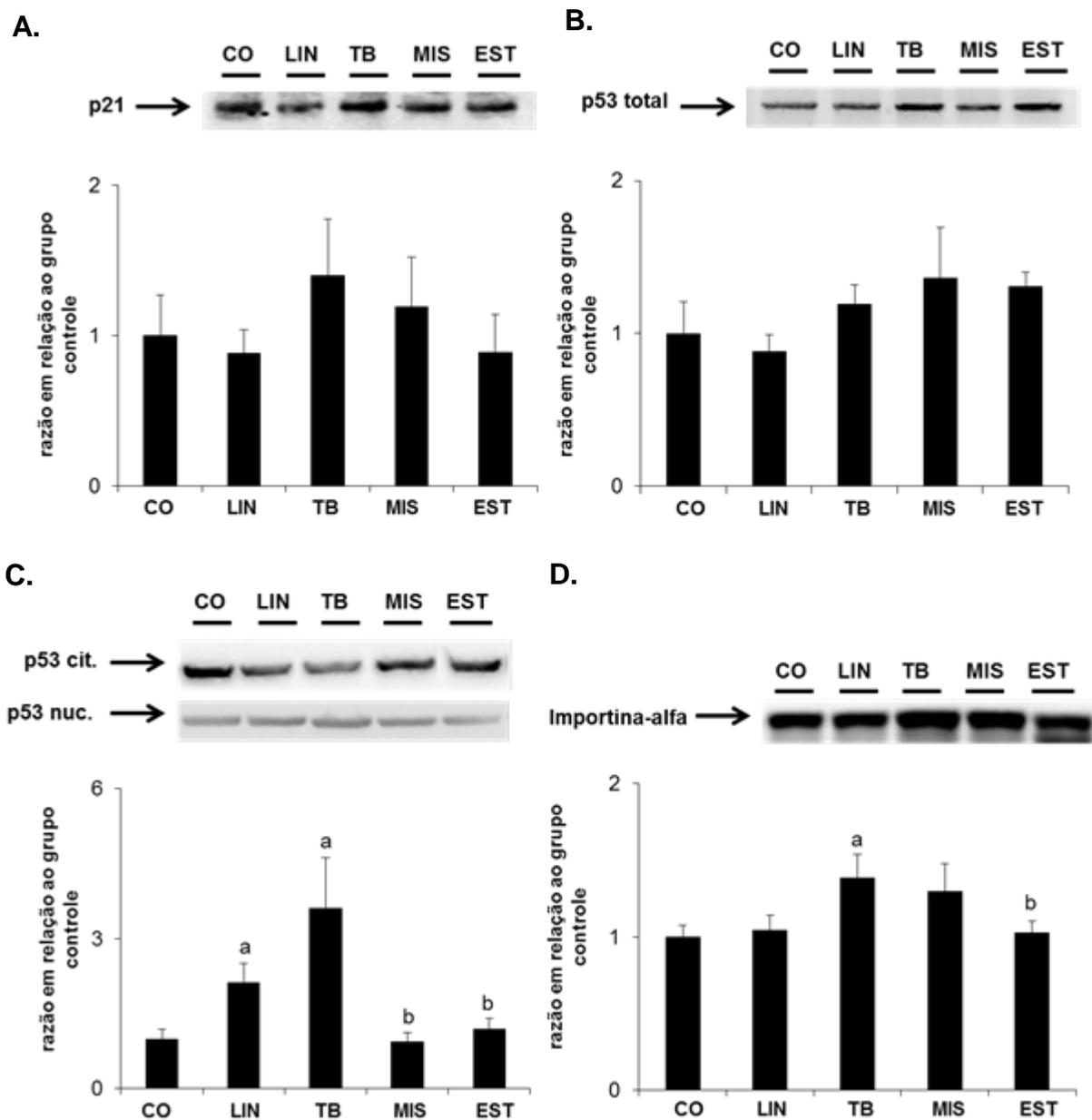


Figura 9: Expressão das proteínas **(A)** p21, **(B)** p53 total e **(C)** sua razão nuclear/citoplasmática, e **(D)** importina-alfa. A análise foi realizada em extrato total ou de frações citoplasmáticas e nucleares de fígado de ratos Wistar não submetidos ao modelo experimental (NI) ou submetidos ao modelo RH e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura simples de óleo de linhaça e tributirina (MIS), ou lipídios estruturados obtidos a partir da esterificação do óleo de linhaça e tributirina (EST). Imagens representativas dos imunoblots são apresentadas. Os resultados expressos são proporcionais à expressão da proteína no grupo CO. Diferença ^{a,b} em relação aos grupos CO e TB, respectivamente,

segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey, $p < 0,05$. Dados expressos na forma de média \pm erro padrão da média ($n=5$).

Proteínas que apresentam o domínio de ligação às ilhotas CpGs metiladas, como a MeCP2 podem condensar a estrutura da cromatina, formar complexos com HDACs, ou ainda bloquear diretamente fatores de transcrição promovendo assim o silenciamento da transcrição gênica (Hamidi, Singh, e Chen 2015). No presente estudo, os grupos MIS e EST apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração total da proteína MeCP2 em relação ao grupo CO. Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) quanto à expressão de MeCP2 nos grupos LIN e TB em relação ao CO (**Figura 10-A**). Alguns genes envolvidos com a proliferação celular e sinalização, dentre eles o CAV-1, podem ser influenciados pela ligação da proteína MeCP2 à sua região promotora (Patra e Betuzzi, 2007). Então, foi avaliada a expressão da proteína Cav-1, porém não foram encontradas diferenças significantes ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais (**Figura 10-B**).

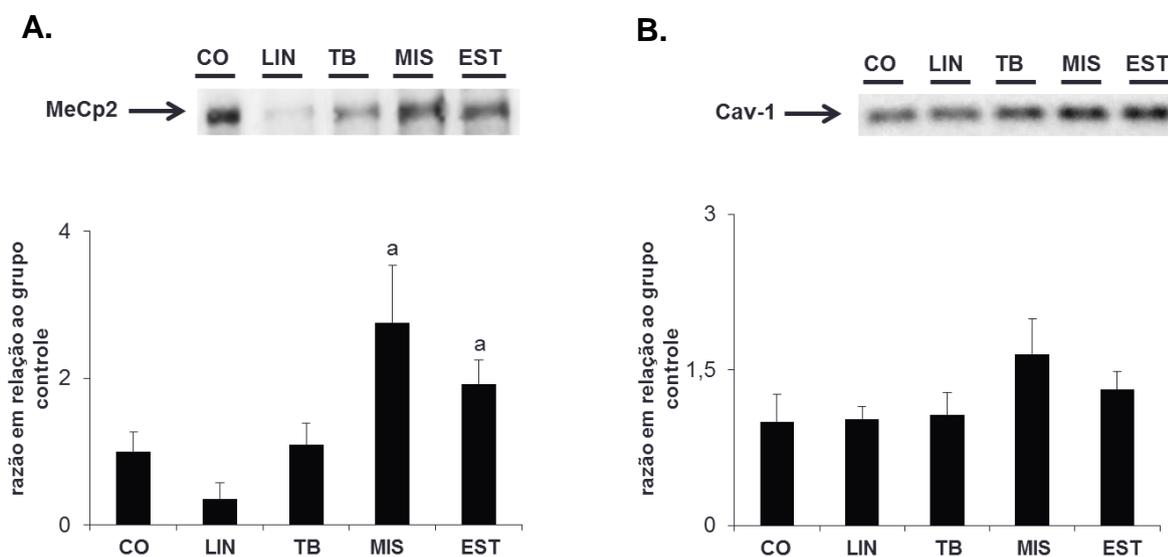


Figura 10: Expressão das proteínas **(A)** MeCP2 e **(B)** Cav-1 em fígados preneoplásicos. A análise foi realizada com proteína total extraída de fígado de ratos Wistar não submetidos ao modelo experimental (NI) ou submetidos ao modelo hepatocarcinogênese do RH e tratados com maltodextrina (CO), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura simples de óleo de linhaça e tributirina (MIS), ou lipídios estruturados obtidos a partir da esterificação do óleo de linhaça e tributirina (EST). Imagens representativas dos imunoblots são apresentadas. Os resultados expressos são proporcionais à expressão da proteína no grupo CO. Diferença ^a em

relação aos grupos CO, segundo teste ANOVA seguido do teste de Tukey, $p < 0,05$. Dados expressos na forma de média \pm erro padrão da média ($n=5$).

4.4. Expressão dos genes *Rassf1*, *Rassf5* e *Cav-1*

Os genes supressores de tumor *Rassf1*, *Rassf5* e *Cav-1* estão epigeneticamente silenciados em diversas neoplasias (Shivakumar *et al.* 2002; Jasmin *et al.* 2006; Buckingham *et al.* 2010). No presente estudo, avaliou-se a expressão desses genes em fases preneoplásicas. Entretanto, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos quanto a expressão dos genes *Rassf1*, *Rassf5* e *Cav-1* analisados por PCR em tempo real (**Figura 11**).

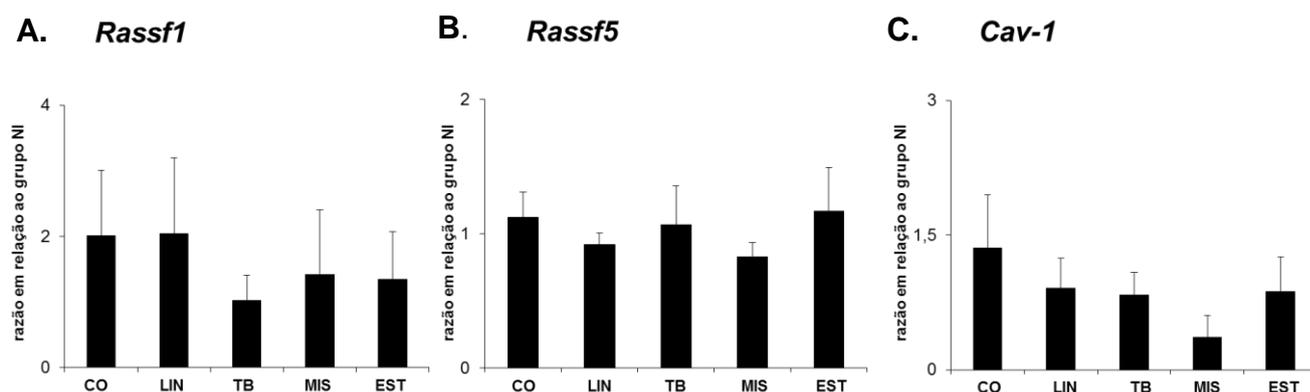


Figura 11: Quantificação da expressão dos genes **(A)** *Rassf1*, **(B)** *Rassf5* e **(C)** *Cav-1* por PCR em tempo real. A análise foi realizada em RNA total, extraído de fígado de ratos Wistar não submetidos ao protocolo experimental ou submetidos ao modelo hepatocarcinogênese do RH e tratados com maltodextrina (CO) ou lipídios estruturados obtidos a partir da esterificação do óleo de linhaça e tributirina (EST). A quantidade de RNA foi normalizada pela expressão do gene constitutivo *Gapdh*. Os resultados expressos são proporcionais à expressão do gene no grupo de animais não submetidos ao protocolo experimental (NI). Teste estatístico Anova seguido do teste de Tukey. Dados expressos na forma de média \pm erro padrão da média ($n=5$).

4.5. Efeitos dos lipídios estruturados na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento de câncer de fígado

A **Figura 12** apresenta os genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$ e razão $> 1,5$) dentre os 84 genes analisados por PCR em tempo real empregando o *RT2 Profiler PCR Array - Liver Cancer Pathways*. A análise demonstrou a maior expressão dos oncogenes *Bcl2* e *Gstp1* e menor expressão de *Fhit*, *Rb1* e *Reln* ($p < 0,05$ e razão $> 1,5$) em animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese experimental em relação aos animais não submetidos ao modelo (grupo NI) (**Figura 12-B**). O grupo TB apresentou maior expressão dos genes *Cdh1*, *Cdkn1a*, *Faz*, *Fhit* e *Socs3*, e menor expressão dos genes *Gstp1* e *Vegfa* ($p < 0,05$ e razão $> 1,5$) em comparação ao grupo CO. O tratamento dos animais submetidos ao protocolo experimental com lipídios estruturados inibiu a expressão ($p < 0,05$ e razão $> 1,5$) de *Bcl2*, *Ccnd2*, *Pdgfra* e *Vegfa* em relação aos animais tratados com maltodextrina (grupo CO). O grupo EST apresentou maior expressão dos genes supressores de tumor *Cdh13*, *Fhit* e *Socs3* em comparação ao grupo CO ($p < 0,05$ e razão $> 1,5$). Adicionalmente, foram observadas diferenças de expressão gênica entre os grupos TB e EST. A expressão dos genes *Ccnd2*, *Cdh1* e *Cdkn1a* foi menor entre os animais submetidos ao modelo e tratados com os lipídios estruturados em relação aos animais tratados com tributirina ($p < 0,05$ e razão $> 1,5$). O gene *Gstp1* apresentou maior expressão no grupo EST em comparação ao grupo TB (**Figura 12-C**).

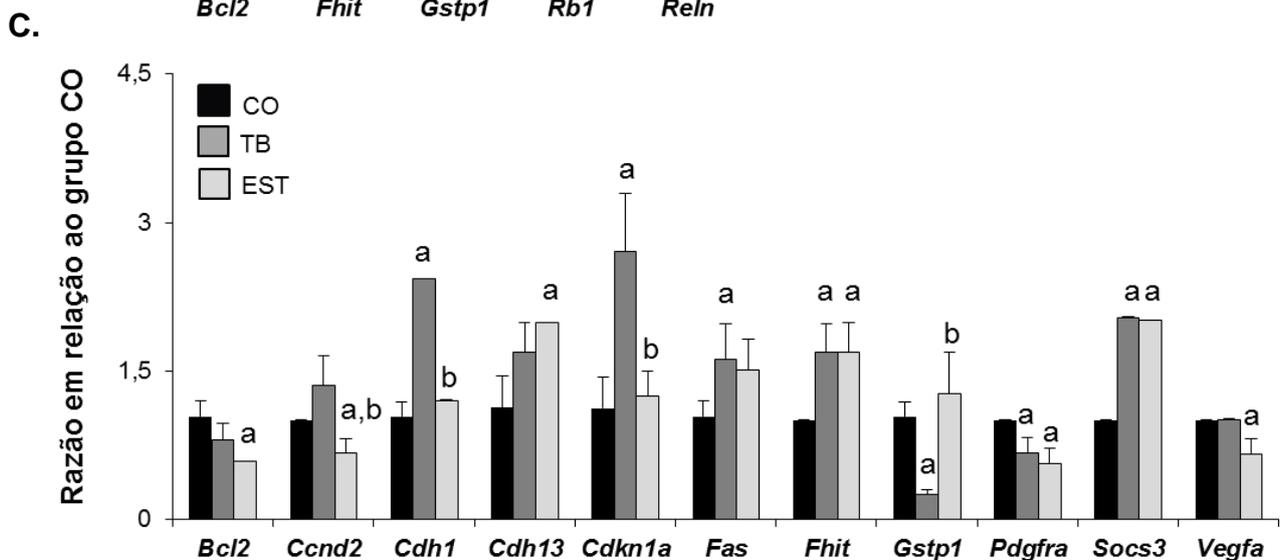
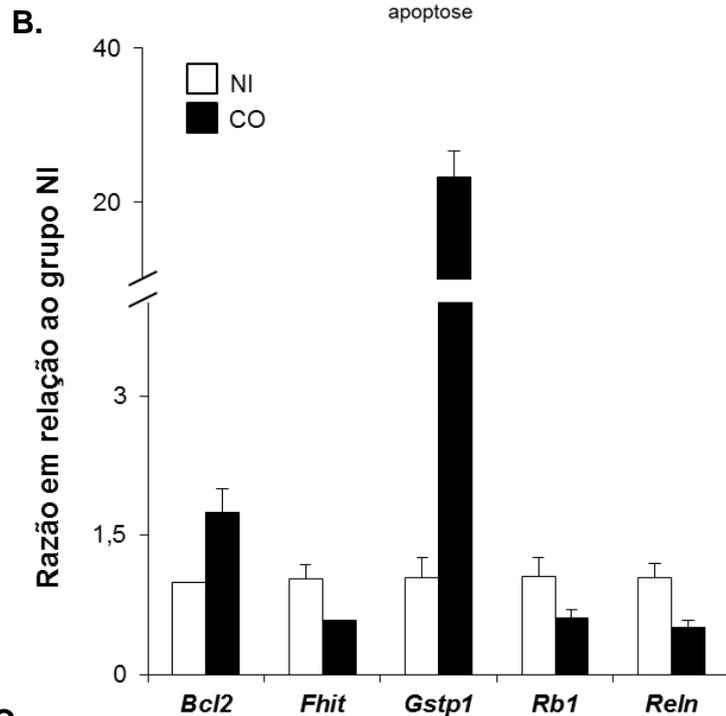
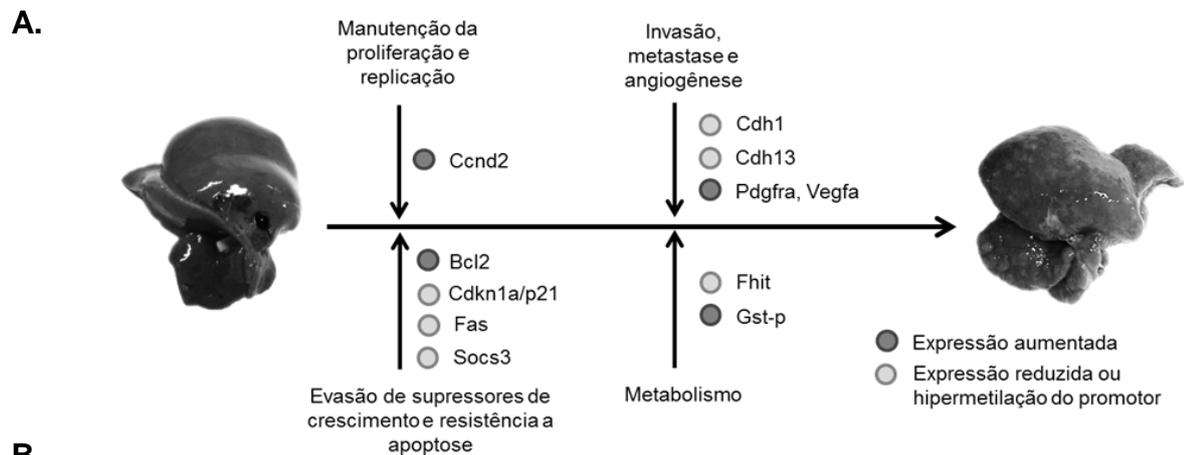


Figura 12: Genes diferencialmente expressos dentre os 84 genes analisados por PCR em tempo real empregando-se o *RT2 Profiler PCR Array - Liver Cancer Pathways*. A análise foi realizada em RNA total, extraído de fígado de ratos Wistar não submetidos ao protocolo experimental ou submetidos ao modelo

hepatocarcinogênese do RH e tratados com maltodextrina (CO), com tributirina (TB) ou lipídios estruturados obtidos a partir da esterificação do óleo de linhaça e tributirina (EST). A quantidade de RNA foi normalizada pela expressão do gene constitutivo *beta-actina*. Esquema representativo sobre o envolvimento dos genes modulados pelos tratamentos no câncer de fígado **(A)**. Resultados expressos são proporcionais à expressão do gene no grupo de animais não submetidos ao protocolo experimental (NI) **(B)** ou do grupo CO **(C)**. Diferença ^{a,b} em relação ao grupo CO e TB, respectivamente. Teste estatístico *t* de Student.

5. Discussão

Nos últimos anos, o conhecimento dos mecanismos moleculares e bioquímicos da carcinogênese tem apontado para a combinação de dois ou mais agentes, terapêuticos ou quimiopreventivos na prevenção do câncer (Chen e Malhotra 2015). A combinação de agentes quimiopreventivos oferece muitas vantagens que promovem o aumento de sua eficácia quimiopreventiva individual, tais como o aumento da biodisponibilidade, atuação em diversos alvos moleculares, e efeitos de sinergia e adição. Nesse sentido, lipídios estruturados desenvolvidos a partir de compostos bioativos de alimentos têm sido considerados uma nova geração de substâncias com potencial quimiopreventivo e, até mesmo, terapêutico para diversas condições patológicas, incluindo o câncer (Fomuso, Corredig, e Akoh 2002; Gruczynska, Przybylski, e Aladedunye 2015).

No presente estudo, lipídios estruturados foram produzidos por interesterificação enzimática da tributirina com óleo de linhaça. O óleo de linhaça utilizado na síntese apresentava menor proporção de triacilgliceróis de ácidos graxos saturados, tendo sido observado que era constituído em sua maior parte por ácidos graxos insaturados, principalmente ALA. A tributirina apresentou apenas ácido butírico em sua constituição. Modificações nos perfis de cristalização e fusão das substâncias isoladas foram observadas após a mistura da tributirina com o óleo de linhaça (mistura não interesterificada) possivelmente por interferência no processo de empacotamento molecular. Por outro lado, após a interesterificação enzimática, os 3 butiratos que estavam presentes inicialmente na tributirina foram redistribuídos com os ácidos graxos provenientes do óleo de linhaça resultando em lipídios estruturados que não apresentaram picos de cristalização e fusão na faixa de temperatura estudada. A ausência de picos após a interesterificação, em comparação com sua presença na mistura antes da reação confirma que a reação de fato ocorreu. A

composição de triacilgliceróis do óleo de linhaça, tributirina e lipídios estruturados obtidos no presente estudo foi idêntica à observada por Heidor *et al.* (2015).

O potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados produzidos por interesterificação enzimática da tributirina com óleo de linhaça foi avaliado quando administrados durante a fase de promoção inicial da hepatocarcinogênese experimental. Para tanto, utilizou-se o modelo do RH, que é adequado para a avaliação de substâncias capazes de modular o processo neoplásico (Solt e Farber 1976; Carrasco-Legleu *et al.* 2004; Espíndola *et al.* 2005).

Os pesos relativos dos fígados e as curvas de crescimento foram semelhantes entre todos os grupos experimentais, sugerindo que nenhum dos tratamentos esteja relacionado à ocorrência de efeitos deletérios e confirmando a maltodextrina como o controle mais adequado dos efeitos calóricos dos lipídios. As perdas de peso e alterações hepáticas em relação ao grupo NI são particularidades inerentes ao modelo do RH. Adicionalmente, não foram observadas diferenças no consumo de ração entre os grupos experimentais (dado não apresentado). Assim, não foram observados sinais de toxicidade relacionados aos tratamentos nas respectivas dosagens utilizadas nos diferentes grupos experimentais.

Os efeitos inibitórios dos lipídios estruturados foram observados por Heidor *et al.* (2015) durante a fase de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese experimental. Entretanto, os estudos de quimioprevenção durante a promoção inicial da carcinogênese são importantes por esta ser uma fase susceptível à reversibilidade (Trosko e Chang 2001). No presente estudo, a atividade quimiopreventiva observada à macroscopia foi confirmada à microscopia pela diminuição significativa do número e área do corte ocupado por lesões preneoplásicas GST-P⁺ persistentes e em remodelação em fígados de animais tratados com tributirina ou lipídios estruturados durante a fase de promoção inicial do modelo RH.

A inibição da proliferação celular e a indução da apoptose são ações sugeridas como responsáveis por atividades quimiopreventivas de muitas substâncias, incluindo o ácido butírico e a tributirina (Ruemmele *et al.* 2003; Pajak, Orzechowski, e Gajkowska 2007; Heidor *et al.* 2012). O butirato atuou como inibidor da proliferação de diversos tipos de linhagens celulares, como no adenocarcinoma de

cólon (Nakano *et al.* 1997; Kinoshita, Suzuki, e Saito 2002; Chen *et al.* 2004), na leucemia, no adenocarcinoma de cérvix uterina, no câncer de mama, no osteossarcoma, no carcinoma de pulmão (Vecchia *et al.* 1997; Gálfi, Neogrády, e Csordás 2002) no hepatocarcinoma (Yamamoto *et al.* 1998; Kinoshita, Suzuki, e Saito 2002). Entretanto, não foi observada diferença no índice de proliferação celular entre os grupos experimentais. Estudos *in vitro* demonstraram que menores doses de ácido butírico e tributirina promovem a inibição da proliferação celular e, um efeito citostático. Em contrapartida, a administração de maiores doses de butirato promovem a indução da apoptose e efeito citotóxico celular (Gabrielli *et al.* 2004). Nesse sentido, aventou-se que a administração da tributirina e de seus lipídios estruturados poderia resultar em altas concentrações de butirato suficientes para induzir apoptose e efeitos citotóxicos em LPN.

A apoptose é induzida de maneira diretamente proporcional à dose e ao tempo de exposição das células à tributirina (Heerdt, Houston, e Augenlicht 1994; Schröder e Maurer 2002; Yan e Xu 2003; Williams *et al.* 2007; Kuefer *et al.* 2004). Assim, o maior índice apoptótico apresentado pelo grupo tributirina justifica-se pela maior concentração hepática de ácido butírico em relação ao grupo CO. Em contrapartida, os animais tratados com lipídios estruturados apresentaram aproximadamente 40% menos ácido butírico hepático, e conseqüentemente, menor índice apoptótico em relação ao grupo tratado com tributirina.

O aumento da apoptose foi observado apenas em rLPN de animais tratados com tributirina ou lipídios estruturados. O mesmo efeito não foi observado em pLPN, indicando que a indução da apoptose pela tributirina e lipídios estruturados possa estar relacionada ao fenômeno da remodelação. Essa relação é evidenciada pelo maior índice apoptótico em rLPN em relação às pLPN do grupo tratado com TB. Resultado semelhante também foi constatado em animais tratados com lipídios estruturados, porém sem significância estatística. Importante destacar que embora os tratamentos com tributirina e lipídios estruturados tenham induzido a apoptose nas rLPN, o mesmo não ocorreu no *surrounding*, sugerindo que ambas as substâncias atuam especificamente em células transformadas, assim como o ácido butírico (Gálfi, Neogrády, e Csordás 2002; Ruemmele *et al.* 2003).

Os mecanismos que envolvem a resistência de células normais, mas não das neoplásicas, à apoptose induzida pelo ácido butírico ainda não estão bem esclarecidos. Sugere-se que as células normais sejam capazes de reverter os efeitos inibitórios do ácido butírico (Heidor *et al.* 2012). Aparentemente, células transformadas não possuem o mesmo mecanismo compensatório, pois frequentemente apresentam defeitos na *checkpoint kinase* (Chk1). A enzima Chk1 desempenha papel essencial na correção de danos em células normais, explicando em parte sua resistência à apoptose induzida por HDACis, como o ácido butírico (Lee *et al.* 2011). Assim, células presentes em LPN são mais susceptíveis aos efeitos citotóxicos da tributirina (McBain *et al.* 1997; Singh, Halestrap, e Paraskeva 1997) e, eventualmente, dos lipídios estruturados. Outra hipótese envolve a menor oxidação do ácido butírico na carcinogênese, como conseqüência do metabolismo anaeróbico em tecido neoplásico. Nesse contexto, ao contrário das células normalmente diferenciadas, que obtêm sua energia a partir da fosforilação oxidativa mitocondrial, as células neoplásicas a obtêm por meio da glicólise, um fenômeno denominado “Efeito Warburg” (Vander Heiden, Cantley, e Thompson 2009). A maior disponibilidade de butirato estaria, portanto relacionada à maior sensibilidade das células transformadas à indução da apoptose principalmente por mecanismos epigenéticos como a inibição de desacetilases de histonas (Ganapathy, Thangaraju, e Prasad 2009).

A tributirina aumentou a acetilação de histonas e a expressão de p21 em fígados preneoplásicos, assim como observado em estudos anteriores (Kuroiwa-Trzmielina *et al.* 2009; de Conti *et al.* 2012; de Conti *et al.* 2013). A acetilação de histonas no grupo EST foi menor em relação ao grupo TB, e similar à do grupo CO, sugerindo que os lipídios estruturados não apresentam atividade de HDACi, provavelmente devido à menor concentração de ácido butírico disponível. Em estudo *in vitro* foi demonstrado que a dose de butirato determina sua utilização em mecanismos epigenéticos, e diferentes genes são acessados quando o butirato é utilizado como cofator de HATs ou HDACis (Donohoe *et al.* 2012).

Apesar de não ter sido avaliada aqui, a acetilação de proteínas não histonas pode afetar sua localização celular, interação, degradação e função (Singh *et al.* 2010). Em estudos anteriores do nosso grupo, o tratamento com tributirina aumentou

a acetilação da proteína p53 e sua localização dentro da célula em fígados preneoplásicos (Kuroiwa-Trzmielina *et al.* 2009; de Conti *et al.* 2013). A proteína p53 é um regulador importante da proliferação celular, reparo de danos no DNA e apoptose; porém, sua função pode ser inibida pela sua compartimentalização celular (Nguyen, Holloway, e Altura 2012). Especificamente, o acúmulo citoplasmático de p53, onde a proteína não é funcional, está relacionado com vários cânceres em humanos, incluindo o HCC (Anzola e Burgos 2004). Além disso, o acúmulo citoplasmático da p53 está relacionado ao aumento na instabilidade genômica em fases iniciais da hepatocarcinogênese, que além de sustentar a expansão clonal, também pode promover modificações genéticas que direcionam a transformação maligna (Van Gijssel 2000; Mazzantini, de Conti, e Moreno 2008). Por outro lado, a atividade inibitória de agentes anti-câncer tem sido associada à indução de apoptose concomitante ao aumento do acúmulo de p53 no núcleo de células presentes nas neoplasias (Hamada *et al.* 1998; Elnakady *et al.* 2004; Almazi *et al.* 2012; Leroy e Asselah 2015; Lu *et al.* 2015). Analogamente, os resultados do presente estudo demonstraram a elevação dos níveis nucleares da proteína p53 e indução de apoptose em fígados preneoplásicos de ratos tratados com tributirina. Entretanto, os animais tratados com lipídios estruturados não apresentaram o mesmo efeito quanto à localização de p53.

O controle da compartimentalização celular de p53 envolve sua interação com proteínas de importação e exportação nuclear. A importação da proteína não ubiquitinada no citoplasma é um fator importante para o acúmulo nuclear de p53, e contribui para sua estabilização (Marchenko *et al.* 2010). A acetilação da importina-alfa aumenta sua interação com a importina-beta e, assim a importação nuclear de proteínas cargo como a p53 (Bannister *et al.* 2000). No presente estudo, observou-se aumento de importina-alfa em fígados preneoplásicos de animais tratados com tributirina, mas não nos tratados com lipídios estruturados. Portanto, os efeitos inibitórios da tributirina, mas não os de lipídios estruturados, estão potencialmente relacionados à maior importação nuclear de p53. Além disso, os resultados sugerem que os mecanismos relacionados à atividade quimiopreventiva da tributirina e dos lipídios estruturados sejam diferentes.

Os efeitos supressores de tumor de lipídios estruturados durante as etapas de iniciação e promoção da carcinogênese foram associados à inibição da ativação de oncogenes pela hipermetilação de histonas em suas regiões promotoras (Heidor *et al.* 2015). No presente estudo, observou-se aumento discreto de histonas H3k27me3 e, diminuição de H3k4me3 e H3k9me3 no grupo EST em comparação ao grupo CO, muito embora não tenham sido significantes estatisticamente. A trimetilação na lisina 4 (H3k4me3) é frequente em promotores de genes transcricionalmente ativos, enquanto que H3k9me3 e H3k27me3 estão presentes em promotores de genes silenciados. As últimas são os principais mecanismos de silenciamento gênico em células de mamíferos; a H3k9me3 trabalha em conjunto com a metilação do DNA, ao contrário da H3k27me3, que em geral atua de forma independente (Sharma, Kelly, e Jones 2010). Além disso, a região promotora de genes silenciados por hipermetilação é ocupada por diversas proteínas como, por exemplo, as que se apresentam MBDs. Proteínas MBDs, como a MeCP2 recrutam enzimas HDAC e metiltransferases de histonas e, assim podem estabelecer o silenciamento da transcrição gênica (Huang *et al.* 2011). No presente estudo, o grupo EST apresentou maior concentração de MeCP2 em comparação ao grupo CO. Nesse sentido, a expressão de genes frequentemente silenciados em diversas neoplasias e genes envolvidos com o desenvolvimento do câncer de fígado foi avaliada a fim de elucidar os mecanismos envolvidos com a atividade quimiopreventiva dos lipídios estruturados.

Os genes *Rassf1*, *Rassf5* e *Cav-1* estão silenciados por metilação em diversos tipos de câncer e, são considerados genes supressores de tumor (Schagdarsurengin *et al.* 2003; Hirasawa *et al.* 2006; Calvisi *et al.* 2009). Entretanto, os resultados não demonstraram diferenças na expressão destes genes entre os grupos experimentais, nem mesmo quanto à expressão da proteína Cav-1. Por outro lado, o tratamento com lipídios estruturados modulou a expressão de alguns oncogenes e genes supressores de tumor relacionados ao desenvolvimento do câncer de fígado.

A resistência a fármacos em várias neoplasias (Kang e Reynolds 2009) e, a persistência de lesões em fígados preneoplásicos de ratos (Mazzantini, de Conti, e Moreno 2008) tem sido relacionada à maior expressão da proteína Bcl-2. Em rLPN hepáticas, o aumento da apoptose foi atribuída à normalização da expressão da Bcl-

2 (Mazzantini, de Conti, e Moreno 2008). No presente estudo, a expressão do gene *Bcl-2* apresentou-se aumentada em fígados preneoplásicos dos animais do grupo CO em relação aos do grupo NI. Além disso, foi observada expressão reduzida deste gene em animais tratados com lipídios estruturados durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese experimental em comparação àqueles tratados com maltodextrina (CO).

Além do papel crítico do *Bcl-2*, a importância da maior expressão do *Ccnd2*, *Gstp1*, *Pdgfa* e *Vegfa* na hepatocarcinogênese é bem reconhecida. Alguns trabalhos clínicos e experimentais demonstraram que as alterações e/ou ativação desses oncogenes pode estar associada ao desenvolvimento do HCC (Patil *et al.* 2009; Feng *et al.* 2010; Hoshida *et al.* 2010). Mecanicamente, a transformação de células normais em neoplásicas induzidas pela maior expressão dos genes *Ccnd2*, *Gstp1*, *Pdgfa* e *Vegfa* está relacionada à desregulação de vias moleculares e celulares associadas a carcinogênese, como a proliferação celular, metabolismo, sinalização celular, migração celular, e angiogênese (Homsí e Daud 2007; Patil *et al.* 2009; Feng *et al.* 2010; Hoshida *et al.* 2010). O tratamento com tributirina reduziu a expressão de *Gstp1* e *Pdgfa*. Entretanto, o tratamento com lipídios estruturados atuou de forma mais eficiente na modulação da expressão dos oncogenes *Ccnd2*, *Pdgfa* e *Vegfa* resultando na normalização de vias de sinalização desreguladas e prevenindo a progressão da hepatocarcinogênese.

Outro achado interessante do presente estudo, foi a modulação da expressão de genes supressores de tumor *Cdh1*, *Cdh13*, *Cdkn1a*, *Fas*, *Fhit* e *SOCS3*. A região promotora da maioria destes genes apresenta-se frequentemente hipermetilada na carcinogênese de fígado e, o reestabelecimento de sua expressão resulta na inibição da proliferação celular e maior susceptibilidade à apoptose (Nan *et al.* 2005; Qian *et al.* 2007; Andreeva e Kutuzov 2010; Feng *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011).

Como argumentado anteriormente, a atuação de um HDACi como a tributirina pode resultar na hiperacetilação das histonas, relaxamento da cromatina e maior acesso de fatores de transcrição, como o p53. A localização nuclear da proteína p53 é essencial para a ativação transcricional de genes envolvidos com o controle do ciclo celular, angiogênese, reparo de DNA, senescência e apoptose (Kuroiwa-

Trzmielina *et al.*, 2009; De Conti *et al.*, 2011). Assim, a maior acetilação de histonas e localização nuclear de p53 pode justificar a maior expressão dos genes *Cdkn1a* e *Fas* observada no grupo de animais tratado com tributirina.

Os tratamentos com tributirina e lipídios estruturados aumentaram significativamente a expressão dos genes *Cdh1* e *Cdh13*, respectivamente, sugerindo que ambos os agentes atuem prevenindo a invasão e metástase. Adicionalmente, a expressão dos genes *Fhit* e *Socs3* foi aumentada em resposta aos tratamentos.

Assim, embora a ativação de genes supressores de tumor possa representar um mecanismo adicional importante na atividade quimiopreventiva dos lipídios estruturados, a modulação da expressão dos oncogenes parece ser o principal mecanismo envolvido com a prevenção da progressão da hepatocarcinogênese no presente estudo.

6. Conclusão

Os lipídios estruturados produzidos por interesterificação enzimática da tributirina com óleo de linhaça e administrados durante a fase de promoção inicial da hepatocarcinogênese experimental apresentam atividade quimiopreventiva comparável a da tributirina quando administrada isoladamente, mesmo resultando menores concentrações hepáticas de ácido butírico. Adicionalmente, os lipídios estruturados não apresentam atividade como HDACi, porém os resultados sugerem que sua ação quimiopreventiva esteja relacionada à modulação da expressão de alguns oncogenes e genes supressores de tumor.

7.Referências bibliográficas

AGGARWAL BB, SHISHODIA S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*, v.71, p.1397-421, 2006.

ALCANTARA EN, SPECKMANN EW. Diet, nutrition, and cancer. *Am J Clin Nutr*, v.29, p.1035-47, 2006.

ALMAZI JG, *et al.* Fludarabine nucleoside induces accumulations of p53, p63 and p73 in the nuclei of human B-lymphoid cell lines, with cytosolic and mitochondrial increases in p53. *Proteomics*, v.6, p.279–90, 2012.

AMES BN, GOLD LS, WILLETT WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci EUA*, v.92, p.5258-65, 1995.

ANDREEVA AV, KUTUZOV MA. Cadherin 13 in cancer. *Genes, chromosome & cancer*, v.49, p.775–90, 2010.

ANZOLA M, BURGOS JJ. Hepatocellular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis. *Expert Rev Mol Med*, v.5, p.1–16, 2004.

BANNASCH P, HAERTEL T, SU Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. *Toxicol Pathol*, v.31, n.1, p.134-9, 2003.

BANNASCH P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis*, v.7, p.689–95, 1986.

BANNISTER A J, *et al.* Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Bio*, v.10, p.467–70, 2000.

BERTRAM J S. The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*, v.21, p.167–223, 2000.

BOMMAREDDY A, *et al.* Effects of dietary flaxseed on intestinal tumorigenesis in Apc(Min) mouse. *Nutr Cancer*, v.61, p.276-83, 2009.

BOSCH FX, *et al.* Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*, v.9, p.191–211, 2005.

BRAY F, *et al.* Global cancer transitions according to the human development index [2008-2030]: a population-based study. *Lancet Oncol*, v.13, p.709-801, 2012.

BUCKINGHAM L, *et al.* PTEN, Rassf1 and DAPK site-specific hypermethylation and outcome in surgically treated stage I and II nonsmall cell lung cancer patients. *Int J Cancer*, v.126, p.1630–9, 2010.

BURDGE GC, LILLYCROP KA. Fatty acids and epigenetics. *Cur Opinion Clin Nut Met Care*, v.17, p. 156–61, 2014.

BURKITT DP, WALKER AR, PAINTER NS. Dietary fiber and disease. *JAMA*, v.229, p.1068-74, 1974.

BURKITT DP. Related disease--related cause? *Lancet*, v.7294, p.7632, 1969.

CALVISI DF *et al.* NORE1A tumor suppressor candidate modulates p21CIP1 via p53. *Cancer Res*, v. 69, p. 4629-37, 2009.

CALVISI DF, *et al.* Altered methionine metabolism and global DNA methylation in liver cancer: relationship with genomic instability and prognosis. *Int J Cancer*, v.121, p. 2410–20, 2007.

CARRASCO-LEGLEU CE, *et al.* Chemoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester on promotion in a medium-term rat hepatocarcinogenesis assay. *Int J Cancer*, v. 108, n. 4, p. 488-92, 2004.

CHEN L, MALHOTRA A. Combination approach: the future of the war against cancer. *Cell Biochem Bioph*, v.72, p.637–41, 2015.

CHEN ST, *et al.* Mutational, epigenetic and expressional analyses of caveolin-1 gene in breast cancers. *Int J Mol Med*, v.14, p.577–82, 2004.

CHEN YX, *et al.* Histone acetylation regulates p21WAF1 expression in human colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol*, v.10, n.18, p.2643-46, 2004.

CHEN ZX, BREITMAN TR. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. *Cancer Res*, v.54, n.13, p.3494-99, 1994.

CLARK WH. Tumour progression and the nature of cancer. *Brit J Cancer*, v.64, p.631-44, 1991.

CLARKE KO, FEINMAN R, HARRISON LE. Tributyrin, an oral butyrate analogue, induces apoptosis through the activation of caspase-3. *Cancer Lett*, v.171, p.57-65, 2001.

CONLEY BA, *et al.* Phase I study of the orally administered butyrate prodrug, tributyrin, in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res*, v.4, p.629-34, 1998.

CORADINI D, *et al.* Effect of sodium butyrate on human breast cancer cell lines. *Cell Prolif*, v.30, p.149-59, 1997.

DANIEL P, *et al.* Pharmacokinetic study of butyric acid administered *in vivo* as sodium and arginine butyrate salts. *Clin Chim Acta*, v.181, n.3, p.255-63, 1989.

DASHWOOD RH, MYZAK MC, HO E. Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? *Carcinogenesis*, v.27, p.344-9. 2006.

DAVIE JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr*, v.133, p.2485S-93S, 2003.

DAVIS CD, MILNER J. Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. *Mutat Res*, v.551, p.51-64, 2004.

DE CONTI A, *et al.* Chemopreventive effects of the dietary histone deacetylase inhibitor tributyrin alone or in combination with vitamin A during the promotion phase of rat hepatocarcinogenesis. *J Nutr Biochem*, v.23, p.860-6, 2012.

DE CONTI A, *et al.* The chemopreventive activity of the butyric acid prodrug tributyrin in experimental rat hepatocarcinogenesis is associated with p53 acetylation and activation of the p53 apoptotic signaling pathway. *Carcinogenesis*, v.34, n.8, p.1900-6, 2013.

DE FLORA S, FERGUSON LR. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*, v.591, p.8–15, 2005.

DEMARK-WAHNEFRIED W, *et al.*, Flaxseed supplementation (not dietary fat restriction) reduces prostate cancer proliferation rates in men presurgery. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.17, p.357-67, 2008.

DIVISI D, DI TOMMASO S, SALVEMINI S, GARRAMONE M, CRISCI R. Diet and Cancer. *Acta Biomed*, v. 77, p. 118-23, 2006.

DOLL R, PETO R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, v.66, p.1191-308, 1981.

DOLL R. Symposium on “Diet and cancer”. *Proc Nutr Soc*, v.49, p.119-31, 1990.

DONOHUE DR, *et al.* The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Mol Cell*, v.48, p.612-26, 2012.

DWIVEDI C, NATARAJAN K, MATTHEES DP. Chemopreventive effects of dietary flaxseed oil on colon tumor development. *Nut Cancer*, v.51, p.52-8, 2005.

EATON SB, KONNER M. Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *New Engl J Med*, v.312, p.283-9, 1985.

EDELMAN MJ, *et al.* Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.51, p.439-44, 2003.

EDEN A, *et al.* Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science (New York, N.Y.)* v.300, p.455, 2003.

EGORIN MJ, *et al.* Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.43, p.445-53, 1999.

ELNAKADY, AY, *et al.* Disorazol A1, a highly effective antimitotic agent acting on tubulin polymerization and inducing apoptosis in mammalian cells. *Biochem Pharm*, v.67, p.927–35, 2004.

ESPÍNDOLA RM, *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-kappa B activation. *Carcinogenesis*, v.26, n.6, p.1091-9, 2005.

ESTELLER M, HERMAN JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol*, v.196, p.1-7, 2002.

FARBER E, RUBIN H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res*, v.51, n.11, p.2751-61, 1991.

FARBER E, SARMA DS. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective." *Lab Inv*, v.56, p.4-22, 1987.

FARBER E. Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. *Cancer Res*, v.55, n.17, p.3759-62, 1995.

FEINBERG AP, TYCKO B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, v.4, p.143-53, 2004.

FENG Q, *et al.* DNA methylation changes in normal liver tissues and hepatocellular carcinoma with different viral infection. *Exp Mol Path*, v.88, p.287-92, 2010.

FEO F, *et al.* Genetic alterations in liver carcinogenesis: implications for new preventive and therapeutic strategies. *Crit Rev Oncog*, v.11, p.19-62, 2000.

FISCHLE W, WANG Y, ALLIS CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Bio*, v.15, p.172-83, 2003.

FITCH MD, FLEMING SE. Metabolism of short-chain fatty acids by rat colonic mucosa *in vivo*. *Am J Physio Gastrointest Liver Physiol*, v.277, p.G31-G40, 1999.

FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the simple isolation and purification of total lipids from animals tissues. *J Biol Chem*, p. 497-509, 1957.

FOMUSO LB, CORREDIG M, AKOH CC. Effect of emulsifier on oxidation properties of fish oil-based structured lipid emulsions. *J Agric Food Chem*, v.50, p.2957-61, 2002.

FONSECA EM. All-trans and 9-cis retinoic acids, retinol and beta-carotene chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve distinct actions on glutathione S-transferase positive preneoplastic lesions remodeling and DNA damage. *Carcinogenesis*, v.26, p. 1940–6, 2005.

FORMAN MR, *et al.* Nutrition and cancer prevention: A multidisciplinary perspective on human trials. *Annu Rev Nutr*, v.24, p.223–54, 2004.

FÜLLGRABE J, KAVANAGH E, JOSEPH B. Histone onco-modifications. *Oncogene*, v.30, p. 3391–403, 2011.

FURTADO KS, POLLETINI J, DIAS MC, RODRIGUES MA, BARBISAN LF. Prevention of rat liver fibrosis and carcinogenesis by coffee and caffeine. *Food Chem Toxicol*, v.64, p.20-6, 2014.

GABRIELLI B, WARRENER R, BURGESS A, BEAMISH H. Defining the chemotherapeutic targets of histone deacetylase inhibitors. *Ann NY Acad Sci*, v. 1030, p. 627-35, 2004.

GÁLFI P, NEOGRÁDY Z, CSORDÁS, A. Apoptosis sensitivity is not correlated with sensitivity to proliferation inhibition by the histone deacetylase inhibitors butyrate and TSA. *Cancer Lett*, v.188, p.141-52, 2002.

GANAPATHY V, THANGARAJU M, PRASAD PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther*, v.121, p.29-40, 2009.

GRUCZYNSKA E, PRZYBYLSKI R, ALADEDUNYE F. Performance of structured lipids incorporating selected phenolic and ascorbic acids. *Food Chem*, v.173, p. 778–83, 2015.

GRUNSTEIN M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, v.389, p.349–52, 1997.

HAMADA Y, MIZOGUCHI M, SUZUKI SO, IWAKI T. Accumulation of class I mutant p53 and apoptosis induced by carboplatin in a human glioma cell line. *Brain Tumor Path*, v.15, p. 77–82, 1998.

HAMER HM, *et al.* Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin Nutr*, v. 28, p.88-93, 2009.

HAMIDI T, SINGH AK, e CHEN T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics*, v.7 ,p.247–65, 2015.

HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, p. 646–74, 2011.

HANAHAN D., WEINBERG R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v.100, p.57–70, 2000.

HAUPT, S, BERGER M, GOLDBERG Z, HAUPT Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, v.116, p.4077–85, 2003.

HEDEMAN H *et al.*, Fat emulsions based on structured lipids (1,3-specific triglycerides): an investigation of the *in vitro* interaction with plasma proteins. *Clin Nutr*, v.15, p. 175-78, 1996.

HEERDT BG, HOUSTON MA, AUGENLICHT LH. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res*, v.54, p.3288-93, 1994.

HEIDOR R, *et al.* Anticarcinogenic actions of tributyrin, a butyric acid prodrug. *Curr Drug Targets*, v.13, p.1720-29, 2012.

HEIDOR R, *et al.* The chemopreventive activity of butyrate-containing structured lipids in experimental rat hepatocarcinogenesis. *Mol Nutr Food Res*, 2015. (aceito para publicação)

HEIDOR R, *et al.* The chemopreventive activity of the histone deacetylase inhibitor tributyrin in colon carcinogenesis involves the induction of apoptosis and reduction of DNA damage. *Tox App Pharm*, v.276, p.129–35, 2014.

HIRASAWA Y, ARAI M, IMAZEKI F, TADA M, MIKATA R, FUKAI K, MIYAZAKI M, OCHIAI T, SAISHO H, YOKOSUKA O. Methylation status of genes upregulated by demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in hepatocellular carcinoma. *Oncology*, v.71, p. 77-85, 2006.

HOMSI J, DAUD AI. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer Control*, v.14, p.285–94, 2007.

HOSHIDA Y, *et al.* Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Disease*, v.30, p.35-51, 2010.

HUANG YW, *et al.* An overview of epigenetics and chemoprevention. *FEBS letters*, v.585, p.2129–36, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER, INCA. Estimativa 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Acesso em: 30 de outubro de 2015.

JASMIN JF, MERCIER I, SOTGIA F, LISANTI MP. SOCS proteins and caveolin-1 as negative regulators of endocrine signaling. *Trends Endocrin Metab*, v.17, p.150–58, 2006.

JENG JH, *et al.* Toxic and metabolic effect of sodium butyrate on SAS tongue cancer cells: role of cell cycle deregulation and redox changes. *Toxicology*, v.223, p.235-47, 2006.

JONES PA, BAYLIN SB. The epigenomics of cancer. *Cell*, v.4, p.683-92, 2007.

KANG HM, REYNOLDS CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res*, v.15, p.1126–32, 2009

KELLOFF GJ, *et al.* Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J Nutr*, v.130, p.467S–71S, 2000.

KINOSHITA M, SUZUKI Y, SAITO Y. Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPAR activation. *Biochem Biophys Res Commun*, v.293, p.827–31, 2002.

KUEFER R, *et al.* Sodium butyrate and tributyrin induce *in vivo* growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. *Br J Cancer*; v.90, p.535-41, 2004.

KUROIWA-TRZMIELINA J, *et al.* Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug. *Int J Cancer*, v.124, p. 2520-27, 2009.

LAI DT, *et al.* Hydrolysis characteristics of bovine milk fat and monoacid triglycerides mediated by pregastric lipase from goats and kids. *J Dairy Sci*, v.80, n.10, p.2249-57, 1997.

LEDER A, LEDER P. Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in cultured erythroleukemic cells. *Cell*, v.5, p.319-22, 1975.

LEE JH, *et al.* Role of checkpoint kinase 1 (Chk1) in the mechanisms of resistance to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci EUA*, v.108, p.19629-34, 2011.

LEROY V, ASSELAH T. Universal hepatitis B vaccination: the only way to eliminate hepatocellular carcinoma? *J Hepatology*, 2015. doi: 10.1016/j.jhep.2015.10.001.

LESCELLE X, *et al.* Butyrate metabolism upstream and downstream acetyl-CoA synthesis and growth control of human colon carcinoma cells. *Eur J Biochem*, v.267, p.6435-42, 2000.

LEVIN S, *et al.* The nomenclature of cell death: Recommendations of an ad hoc committee of the society of toxicologic pathologists. *Toxicologic Pathology*, v.27, p.484–490, 1999.

LI Y, *et al.*, Emulsion-based delivery systems for tributyrin, a potential colon cancer preventative agent. *J Agric Food Chem*, v.57, p.9243-49, 2009.

LITVAK DA, *et al.* Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate. *Anticancer Res*, v.20, p.779-84, 2000.

LOEB AL, LOEB KR, ANDERSON JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci Eua*, v.100, p.776–81, 2003.

LU Z, *et al.* Mechanism of Arctigenin-Induced Specific Cytotoxicity against Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines: Hep G2 and SMMC7721. *PloSone*, v.10, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0125727.

LUCH A. Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nature Rev. Cancer*, v.5, p.113–25, 2005.

MAIER S, *et al.* Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen resistant human prostate cancer cell lines. *Int J Cancer*, v.88, p.45-51, 2000.

MARANHÃO RC *et al.* Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids*,v.28, p.691-6,1993.

MARCHENKO ND, *et al.* Stress-mediated nuclear stabilization of p53 is regulated by ubiquitination and importin-alpha3 binding. *Cell Death Differ*, v.17, p.255–67. 2010.

MARRERO JA. Hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol*, v.21, p.308–12, 2005.

MARTÍN D, *et al.* *In vitro* intestinal bioaccessibility of alkylglycerols versus triacylglycerols as vehicles of butyric acid. *Lipids*, v.46, p.277–85, 2011.

MAZZANTINI RP, DE CONTI A, MORENO FS. Persistent and remodeling hepatic preneoplastic lesions present differences in cell proliferation and apoptosis, as well as in p53, Bcl-2 and NF-κB pathways. *J Cell Biochem*, v.103, p.538–46, 2008.

McBAIN JA, EASTMAN A, NOBEL S, MUELLER GC. Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Biochem Pharmacol*, v. 53, p.1357–68, 1997.

McNEIL NI, CUMMINGS JH, JAMES WP.Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. *Gut*, v.19, p.819-22, 1978.

MILLER AA, *et al.* Clinical pharmacology of sodium butyrate in patients with acute leukemia. *Eur J Cancer Clin Oncol*, v.23, p.1283-87, 1987.

MIYOSHI M, *et al.* Oral administration of tributyrin increases concentration of butyrate in the portal vein and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *Clin Nutr*, v.30, p.252-58, 2011.

NAKANO K, *et al.* Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. *The J Bio Chem*, v.272, p.22199–206, 1997.

NAN KJ, *et al.* Expression of fragile histidine triad in primary hepatocellular carcinoma and its relation with cell proliferation and apoptosis. *World J Gastroenter*, v.11, p.228–31, 2005.

NGUYEN KT, HOLLOWAY MP, e ALTURA RA. The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *Int J Biochem Mol Bio*, v.3, p.137–51, 2012.

ONG TP, CARDOZO MT, DE CONTI A, MORENO FS. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis with dietary isoprenic derivatives: cellular and molecular aspects. *Curr Cancer Drug Targets*, v.12, p.1173–90, 2012.

ONG TP, *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, p.1194-203, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, OMS. Cancer ficha 297. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 27 de out. 2015.

PAJAK B, ORZECZOWSKI A, GAJKOWSKA B. Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Adv Med Sci*, v.52, p.838–88, 2007.

PARODI PW. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J Nutr*, v.127, p.1055-60, 1997.

PATIL MA, *et al.* Role of cyclin D1 as a mediator of c-Met- and beta-catenin-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, v.69, p.253–61, 2009.

PATRA SK, BETTUZZI S. Epigenetic DNA-methylation regulation of genes coding for lipid raft-associated components: A role for raft proteins in cell transformation and cancer progression (Review). *Oncol Rep*, v.17, p.1279-90, 2007.

PITOT HC Pathway of progression in hepatocarcinogenesis. *Lancet*, v.358, p.859–60, 2001.

PITOT HC, DRAGAN YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.*, v. 5, p. 2280–86, 1991.

PITOT HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, v.72, p.962–70, 1993.

POGRIBNY IP, RUSYN I, BELAND FA. Epigenetic aspects of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogenesis: studies in rodents. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 49, p. 9-15, 2008.

POIRIER, M.C. Chemical-induced DNA-damage and human cancer risk. *Nat. Rev. Cancer*, v. 4, n. 8, p. 630-37, 2004.

PRASAD KN, SINHA PK. Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review. *In vitro*, v.12, p.125-32, 1976.

QIAN ZR, *et al.* Tumor-specific downregulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas. *Modern Path*, v 20, p.1269–77, 2007.

RATNAYAKE WMN, GALLI C., Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. *Ann Nut Metab*, v.55, p.8–43, 2009.

REPHAELI A, *et al.* Butyrate-induced differentiation in leukemic myeloid cells *in vitro* and *in vivo* studies. *Int J Oncol*, v.4, p.1387-91, 1994.

RIZZI MBSL, *et al.* b-Carotene inhibits persistent and stimulates remodeling gGT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. *Int J Vitam Nutr Res*, v.67, p.415-22, 1997.

ROSE DJ, *et al.* Influence of dietary fiber on inflammatory bowel disease and colon cancer: Importance of fermentation pattern. *Nutr Rev*, v.65, p.51–62, 2007.

ROY S, PACKMAN K, JEFFREY R, TENNISWOOD M. Histone deacetylase inhibitors differentially stabilize acetylated p53 and induce cell cycle arrest or apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Death Differ*, v.12, p.482–91, 2005.

RUEMMELE FM, *et al.* Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut*, v. 52, p. 94-100, 2003.

SADLI N, ACKLAND ML, DE MEL D, SINCLAIR AJ, SUPHIOGLU C. Effects of Zinc and DHA on the Epigenetic Regulation of Human Neuronal Cells. *Cell Phys Biochem*, v.29, p.87–98, 2012.

SANTOS-ROSA H, CALDAS C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Euro J Cancer*, v.41, p.2381–402, 2005.

SCHAGDARSURENGIN U, *et al.* Frequent epigenetic inactivation of the *Rassf1A* gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*; v.22, p.1866–71, 2003.

SCHEPPACH W, *et al.* Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa *in vitro*. *JPEN: J Parenter Enteral Nutr*, v.16, p.43-8, 1992.

SCHMITTGEN TD e LIVAK KJ. Analyzing real-time pcr data by the comparative ct method. *Nature Protocols*, v. 3 p.1101–8, 2008.

SCHRÖDER C, MAURER HR. Tributyrin-induced differentiation promotes apoptosis of LS 174T colon cancer cells *in vitro*. *Int J Oncol*, v.20, p.195-200, 2002.

SEGURA N, SILVA RC, SOARES FASM, GIOIELLI LA, JACHMANIÁN I. Valorization of beef tallow by lipase-catalyzed interesterification with high oleic sunflower oil. *J Am Oil Chem Soc*, v.88, p.1945-54, 2011.

SEMPLE-ROBERTS E *et al.*, Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. *Int J Cancer*, v.40, p.643–45, 1987.

SHARMA S, KELLY TK, e JONES PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, v.31, p. 27–36, 2010.

SHIVAKUMAR L, *et al.* The Rassf1A Tumor Suppressor Blocks Cell Cycle Progression and Inhibits Cyclin D1 Accumulation. *Mol Cell Bio*, v.22, p. 4309–18, 2002.

SILVA RC, *et al.* Continuous enzymatic interesterification of lard and soybean oil blend: effects of different flow rates on physical properties and acyl migration. *J Mol Catal B Enzym*, v.76, p.23-8, 2012.

SILVA RC, *et al.* The effects of enzymatic interesterification on the physical-chemical properties of blends of lard and soybean oil. *Food Sci Tech*, v.42, p.1275-82, 2009.

SIMOPOULOS AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, v.56, p.365–79, 2002.

SINGH B, *et al.* Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Exp Rev Anticancer Ther*, v.10, p.935–54, 2010.

SINGH B, HALESTRAP AP, PARASKEVA C. Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis*, v. 18, p.1265–70, 1997.

SOLT D, FARBER E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, v.263, p.701-3, 1976.

SPORN MB, *et al.* Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc*, v.35, n.6, p.1332-8, 1976.

SPORN MB, SUH N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nat Rev Cancer*, v.2, n.7, p.537-743, 2002.

STEIN J. Chemically defined structured lipids: current status and future directions in gastrointestinal diseases. *Int J Colorectal Dis*, v.14, p.79-85, 1999.

STEPHENSON JA, *et al.* The multifaceted effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the hallmarks of cancer. *J Lipids*, 13 páginas, 2013.

STOMMEL JM, *et al.* A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J*, v.18, p.1660–72, 1999.

STONER GD, MORSE MA, KELLOFF GJ. Perspectives in cancer chemoprevention. *Environ Health Perspect*, v.105, p.945-54, 1997.

SU J, HE L, ZHANG N, HO PC. Evaluation of tributyrin lipid emulsion with affinity to low-density lipoprotein: pharmacokinetics in adult male Wistar rats and cellular activity on Caco-2 and HepG2 cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*, v.316, p.62-70, 2006.

TOLEDO LP, *et al.* Inhibitory effects of lutein and lycopene on placental glutathione S-transferase-positive preneoplastic lesions and DNA strand breakage induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis. *Nutr Cancer*, v.47, n.1, p.62-9, 2003.

TROSKO JE, CHANG EC. Mechanism of up-regulated gap junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. *Mutat Res/Fund Mol Mec Mutagen*, v.480-481, p.219–29, 2001.

TURNER, B.M. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, v. 12, n. 2, p. 110-112, 2005.

UMAR A, DUNN BK, GREENWALD P. Future directions in cancer prevention. *Nat Rev Cancer*, v.12, p.835-48, 2012.

VAN GIJSSEL, H. Loss of Nuclear p53 Protein in Preneoplastic Rat Hepatocytes Is Accompanied by Mdm2 and Bcl-2 Overexpression and by Defective Response to DNA Damage *In vivo*. *Hepatology*, v.32, p.701–10, 2000.

VANDER HEIDEN MG, CANTLEY LC, THOMPSON CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, v.324, p.1029-33, 2009.

VECCHIA MG, *et al.* Acetate and propionate potentiate the antiproliferative effect of butyrate on RBL-2H3 growth. *GenPharmac*, v.29, p.725-28, 1997.

VELÁZQUEZ OC, *et al.* Butyrate inhibits seeding and growth of colorectal metastases to the liver in mice. *Surgery*, v.120, p.440-47, 1996.

VELAZQUEZ OC, LEDERER HM, ROMBEAU JL. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol*, v.427, p.123-34, 1997.

VERNA L, WHYSNER J, WILLIAMS GM. 2-Acetylaminofluorene mechanistic data and risk assessment: DNA reactivity, enhanced cell proliferation and tumor initiation." *Pharmacology & Therapeutics*, v.71, p.83–105, 1996 (b).

VERNA L, WHYSNER J, WILLIAMS GM. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol. Ther.*, v. 71, p. 57-81, 1996 (a).

WALKER GE, *et al.* Butyrate, a histone deacetylase inhibitor, activates the human IGF binding protein-3 promoter in breast cancer cells: molecular mechanism involves an Sp1/Sp3 multiprotein complex. *Endocrinology*, v.142, p.3817-27, 2001.

WANG P, *et al.* P53 Domains: Structure, Oligomerization, and Transformation. *Mol Cell Bio*, v.14, p.5182–91, 1994.

WATKINS SM *et al.* Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumour cells. *J Dairy Res*, v. 66, p.559-67, 1999.

WILLIAMS D, *et al.* Flax seed oil and flax seed meal reduce the formation of aberrant crypt foci (ACF) in azoxymethane-induced colon cancer in Fisher 344 male rats. *Food Chem. Toxicol.* v.45, p.153-59, 2007.

YAMAGUCHI H, *et al.* P53 Acetylation Is Crucial for Its Transcription-Independent Proapoptotic Functions. *J Bio Chem*, v. 284, p.11171–83, 2009.

YAMAMOTO H, *et al.* Suppression of growth of hepatocellular carcinoma by sodium butyrate *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer*, v.76, p.897-902, 1998.

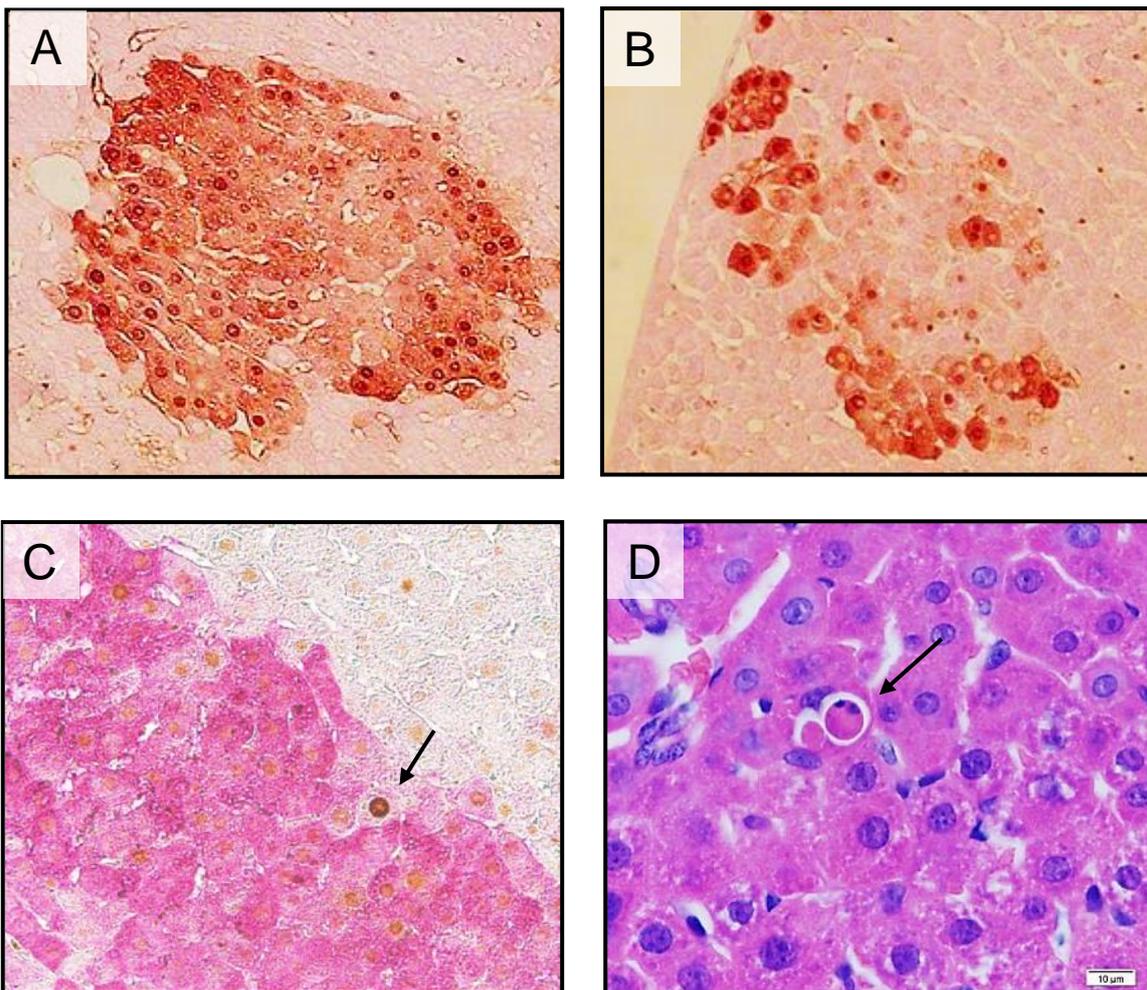
YAN J, XU YH. Tributyrin inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest. *World J Gastroenterol*, v. 9, p. 660-64, 2003.

YANG XJ, SETO E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*, v.31, p.449–61, 2008.

YOUNG MR, YAN HS, COLBURN NH. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kB and Pdc4. *Trends Mol. Med.*, v. 9., n. 1, p. 36-41, jan. 2003.

YU MC, YUAN JM. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, v.127, S72–8, 2004.

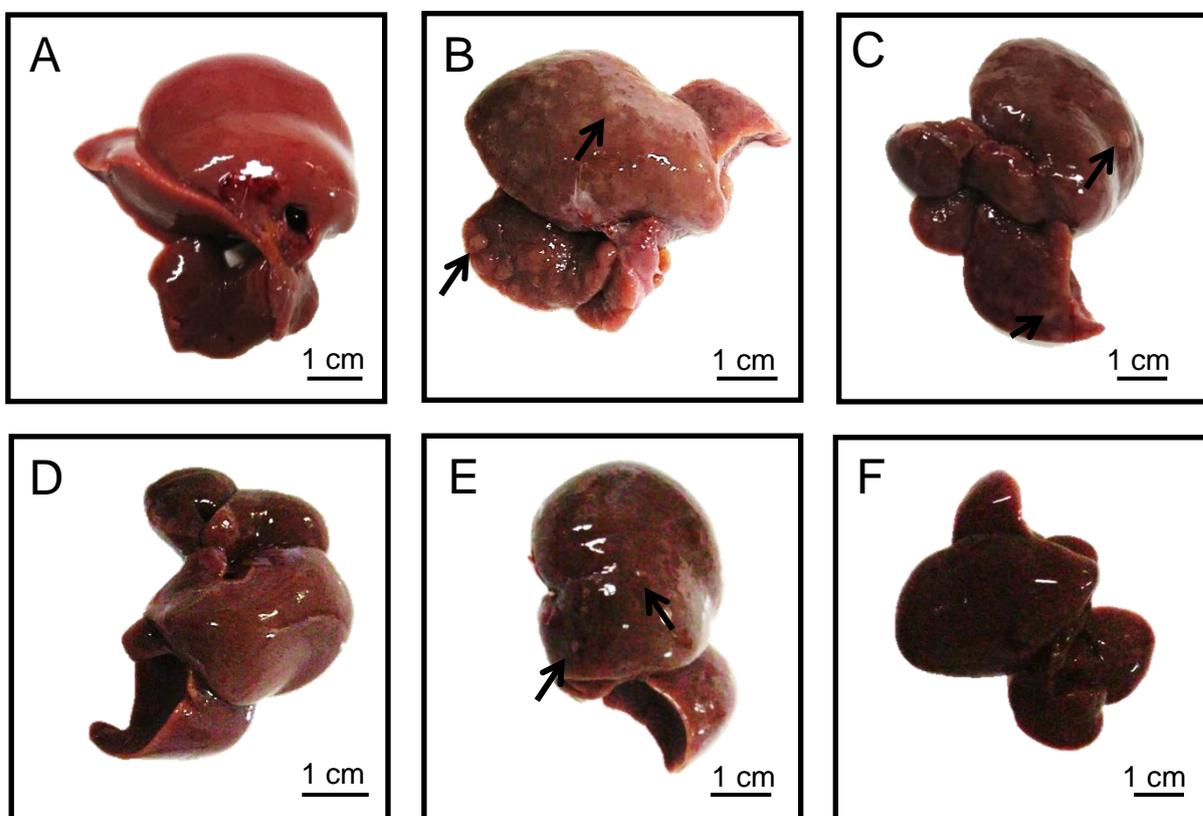
ZHAO Y, *et al.* Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(Waf1/Cip1). *Mol Cell Bio*, v.26, p. 2782–90. 2006.



Apêndice 1: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado. Imunomarcção pela GST-P permite a distinção de lesões preneoplásicas (Objetiva 10X) **(A)** persistentes (bordas definidas e marcação uniforme) e, **(B)** em remodelação (bordas irregulares e marcação não-uniforme no interior do foco). **(C)** Dupla-marcação imunoistoquímica para GST-P (rosa) e PCNA (marrom). A seta indica núcleo em fase S marcado para PCNA. Objetiva de 40X. **(D)** A seta indica hepatócito em apoptose corado por HE. Objetiva de 100X.

Apêndice 2: Anticorpos primários utilizados e suas diluições:

Anticorpo ↑ ário	Produzido em	Diluição	Companhia
H3k9 ac	rabbit	1:5000	Cell Signalling
H3k4 me3	rabbit	1:30000	Cell Signalling
H3k9 me3	rabbit	1:10000	Cell Signalling
H3k27 me3	rabbit	1:1000	Cell Signalling
p21	rabbit	1:5000	Sigma-Aldrich
p53	mouse	1:4000	Abcam
Importina-alfa	mouse	1:500	Abcam
MeCP2	rabbit	1:1000	Cell Signalling
Cav-1	rabbit	1:1000	Sigma-Aldrich



Apêndice 3: Fotografia digital em que são representados os fígados dos animais **(A)** não submetidos ao modelo experimental e; submetidos ao modelo RH e **(B)** tratados com maltodextrina, **(C)** óleo de linhaça, **(D)** tributirina, **(E)** mistura não esterificada ou **(F)** lipídios estruturados. As setas indicam a presença de LPN hepáticas visíveis macroscopicamente.