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

Atividade quimiopreventiva do ácido fólico quando suplementado continuamente durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese em ratos

Carlos Eduardo Andrade Chagas

Tese apresentada para a obtenção do título de DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno

São Paulo

2010

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

Atividade quimiopreventiva do ácido fólico quando suplementado continuamente durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese em ratos

Carlos Eduardo Andrade Chagas

Tese apresentada para a obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno

São Paulo

2010

Carlos Eduardo Andrade Chagas

Atividade quimiopreventiva do ácido fólico quando suplementado continuamente durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese em ratos.

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno

orientador/presidente

_____

1º. examinador

_____

2º. examinador

_____

3º. examinador

_____

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico essa Tese a todos aqueles que me respeitaram, me incentivaram a atingir meus objetivos e me deram oportunidades durante o período de pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Esse espaço é dedicado não apenas as pessoas que contribuíram para a realização dessa Tese, mas também para aquelas que foram extremamente importantes para a minha vida pessoal e profissional no decorrer dessa estrada chamada pós-graduação. Certamente, não conseguirei expor todo o meu carinho e gratidão a essas pessoas com palavras, mas faço questão de escrever algumas delas para agradecer:

Ao meu colendo orientador Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno. Foi um enorme prazer conviver com um dos maiores expoentes da pesquisa em Nutrição no Brasil. Cheguei ao seu Laboratório com 21 anos, e hoje, aos 28, digo com plena certeza que pude aprender não apenas sobre pesquisa, mas também bastante sobre a vida. Agradeço em especial pela constante auspiciosidade. Sobre as rusgas, acredito que todas foram necessárias para ambos e fundamentais para minha maturidade pessoal e profissional. Nesse sentido, transcrevo duas frases que ilustram bem o que aprendi com elas: *"O mais importante ingrediente na fórmula do sucesso é saber como lidar com as pessoas"* (Theodore Roosevelt); *"A arte da conquista é conquistar as pessoas como elas são, e não querer mudá-las para nos conquistar"* (Aline Davila). Embora escassos devido à rotina do Laboratório e pelas atribuições burocráticas de Professor Titular, aproveito o ensejo para agradecer ainda pelos momentos em que podemos conversar sobre Universidade, SBAN, CAPES, CNPq, FAPESP, avaliações, etc... Espero poder continuar a colaborar e contar sempre com o seu apoio!

Ao meu amigo Prof. Dr. Thomas Prates Ong. Uma pessoa de um caráter ímpar, fundamental em minha trajetória profissional e que nunca se negou a me ouvir. Apesar das dificuldades e dos problemas, sempre acreditou no meu potencial e me proporcionou inúmeras oportunidades profissionais dentro e fora da USP. Pude acompanhar o seu início como docente da FCF e tive a satisfação de ser convidado a colaborar com a sua disciplina e com os projetos de suas primeiras alunas de pós-graduação. Agradeço também pela amizade e convivência *extra muros.* Seja no bandeijão ou em qualquer outro restaurante mais sofisticado, foi um prazer poder contar com a sua companhia! *"O prazer dos banquetes não está nos pratos, mas sim nas pessoas que acompanham a mesa"* (Raquel Araújo).

Ao técnico do Laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer, Renato Heidor, pela descontração, tranqüilidade, mas acima de tudo pelo respeito e amizade. Faço questão de manter a convivência com você após minha saída do grupo!

À agora Dr[a]. Bruna Kempfer Bassoli, pela ajuda na condução dos experimentos, e à Mestre Giuliana Paola Cruzeta pela amizade e companheirismo. Não poderia deixar de agradecer a outros dois ex-membros do Grupo: à ex-aluna de iniciação científica Camila Souza pela colaboração com o Projeto e ao Dr. Rogério Mazzantini, por ter me ensinado os primeiros conceitos de Biologia Molecular.

À minha querida esposa Luciana. Companheira de todas as horas, ela foi extremamente compreensiva nos diversos momentos em que não pude propiciar uma melhor condição financeira a nossa família bem como o carinho e atenção necessária devido à rotina de pós-graduando. Sempre me incentivou a correr atrás de meus sonhos. Sou eternamente grato pelo seu amor integral!

À família Yoshime (Horácio, Nilcea, Isaltina e Alex), ao meu pai Manuel, meu irmão Felipe (Zé) e em especial à minha mãe Vera, pelo apoio incondicional a minha decisão de fazer pós-graduação e me ajudar no que fosse possível, seja financeiramente, espiritualmente ou simplesmente pela presença constante nos diversos momentos difíceis nos últimos sete anos. Agradeço ainda aos meus pais por terem me educado e me passado valores imprescindíveis e, infelizmente, pouco encontrados nas pessoas hoje em dia. *"Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos"* (Friedrich Nietzsche).

Aos meus **VERDADEIROS AMIGOS** André Vilela, Cristiano Vilela, Rafael Gossn, Rafael Passos e, especialmente, a Gustavo Reis e ao também pós-graduando Felipe Loureiro. *"Há poucos homens capazes de prestar homenagem ao sucesso de um amigo, sem qualquer inveja"* (Ésquilo). Agradeço sempre a felicidade de poder conviver e conversar com vocês a cada momento seja ele alegre ou triste!!!

Às Prof[as]. Dr[as]. Sandra Vivolo, Patrícia Rondó e Nágila Damasceno, pelo convite para ser professor substituto junto à Disciplina "Fisiopatologia da Nutrição" para os alunos do Curso de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP. Foi a realização de um

sonho antigo, justamente o que inicialmente me motivou a seguir à carreira acadêmica: poder contribuir com a formação de futuros Nutricionistas.

Aos membros da Congregação, da Comissão de Pós-Graduação, do Comitê de Ética em Pesquisa no período de 2006 a 2008 e aos membros do Conselho de Pesquisa e do Conselho Universitário no período de 2009 a 2010 pela convivência, respeito e aprendizado.

Aos membros da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição a partir de 2007, em especial ao Prof. Dr. Marcelo Rogero, Dr. Alexandre Lobo e ao Prof. Cézar de Azevedo, integrantes da Comissão Técnica de Cursos, pelo respeito, convivência e carinho de suas amizades.

Aos membros do Laboratório de Patologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP por possibilitarem a utilização de seu criostato e espectrofotômetro.

Aos funcionários do Biotério do IQ-FCF/USP pelo cuidado e auxílio com os animais durante o período do experimento.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pela ajuda.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, em especial a Elaine, pela ajuda e auxílio com a formatação dessa Tese.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

À FAPESP pelo auxílio financeiro fundamental para a realização do estudo.

À CAPES pelo auxílio PROEX.

RESUMO

CHAGAS, C.E.A. Atividade quimiopreventiva do ácido fólico quando suplementado continuamente durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese em ratos. 71 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos - área de concentração: Nutrição Experimental) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A ingestão de folato é inversamente associada com o risco de diversos cânceres. Apesar da deficiência dessa vitamina ser classicamente considerada fator de risco para câncer de fígado, não existem estudos avaliando o efeito da suplementação com ácido fólico (AF) durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com AF continuamente durante as etapas de iniciação e seleção/promoção da hepatocarcinogênese em ratos. Os animais receberam diariamente 0,08 mg (grupo AF8) ou 0,16 mg (grupo AF16) de AF/100 g de peso corpóreo ou água (grupo controle [GC]). Após duas semanas de tratamento, todos os animais foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente" (iniciação com dietilnitrosamina, seleção/promoção com 2-acetilaminofluoreno e hepatectomia parcial a 70%). A eutanásia dos animais ocorreu após 8 semanas de tratamento. Quando comparado ao GC, o grupo AF16, mas não o AF8, apresentou menores nódulos macroscópicos ($p<0,05$), menor ($p<0,05$) número de lesões pré-neoplásicas (LPN) persistentes, maior ($p<0,05$) número de LPN em remodelação, menor ($p<0,05$) proliferação celular nas LPN persistentes, menos ($p<0,05$) danos no DNA hepático e tendência ($p<0,10$) a apresentar menor expressão de *c-myc* em LPN microdissecadas. Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos experimentais com relação à indução de apoptose nas LPN persistentes e em remodelação bem como no padrão de metilação global do DNA em LPN microdissecadas. Em resumo, a suplementação com AF durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese resultou em atividade quimiopreventiva de forma dose-efeito. Alteração no fenótipo das LPN, inibição de danos no DNA hepático e da expressão de *c-myc* representam relevantes efeitos celulares e moleculares dessa vitamina.

Palavras-chave: ácido fólico, hepatocarcinogênese, quimioprevenção, lesões pré-neoplásicas, remodelação.

ABSTRACT

CHAGAS, C.E.A. Chemoprevention of early rat hepatocarcinogenesis with folic acid supplementation. 71 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos - área de concentração: Nutrição Experimental) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Dietary intake of folate is inversely associated with the risk of several malignancies. Although folate deficiency is associated with liver cancer, there is no data on folic acid (FA) supplementation during hepatocarcinogenesis. The aim of the present study was to evaluate the effect of FA supplementation during early hepatocarcinogenesis. Rats receiving daily 0.08 mg (FA8 group) or 0.16 mg (FA16 group) of FA/100 g body weight or water (CO group, controls) were used. After a 2 week-treatment, all animals were submitted to the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis (initiation with diethylnitrosamine, selection/promotion with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy). All animals were euthanized after 8 weeks of treatment. When compared to CO group, FA16 group, but not FA8 group, presented: smaller ($p < 0.05$) macroscopic nodules; reduced ($p < 0.05$) number of persistent and increased ($p < 0.05$) number of remodeling preneoplastic lesions (PNL); reduced ($p < 0.05$) cell proliferation in persistent PNL; decreased ($p < 0.05$) hepatic DNA damage; and a tendency ($p < 0.10$) of decreased *c-myc* expression in microdissected PNL. No differences ($p > 0.05$) were observed between CO, FA8 and FA16 groups regarding apoptosis in both persistent and remodeling PNL, and global DNA methylation pattern in microdissected PNL. In conclusion, FA supplementation during early hepatocarcinogenesis resulted in a dose-response chemopreventive activity. Reversion of PNL phenotype and inhibition of DNA damage and of *c-myc* expression represent relevant FA cellular and molecular effects.

Keywords: folic acid, hepatocarcinogenesis, chemoprevention, preneoplastic lesions, remodeling.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Visão geral do metabolismo dos grupamentos metil.	p. 08
FIGURA 2	Delineamento experimental para avaliação do efeito quimiopreventivo do ácido fólico quando suplementado durante as etapas de iniciação e promoção a ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.	p. 17
FIGURA 3	Foto do equipamento de microdissecção.	p. 24
FIGURA 4	Fotomicrografias das etapas da microdissecção de LPN hepáticas coradas com H&E.	p. 24
FIGURA 5	Número médio de LPN/cm2 de corte histológico de ratos tratados com água (controles) ou AF durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese.	p. 32
FIGURA 6	Área média das LPN/cm2 de corte histológico de ratos tratados com água (controles) ou AF durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese.	p. 32
FIGURA 7	Porcentagem de área do corte histológico ocupada pelas LPN de ratos tratados com água (controles) ou AF durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese.	p. 33
FIGURA 8	Avaliação da proliferação celular de ratos tratados com água (controles) ou AF durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese.	p. 34
FIGURA 9	Avaliação da apoptose de animais tratados com água (controles) ou AF durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese.	p. 35
FIGURA 10	Avaliação de danos no DNA hepático de ratos tratados com água (controles) ou AF durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese.	p. 36

FIGURA 11 Avaliação do padrão de metilação global do DNA hepático especificamente de amostras obtidas por procedimento de microdissecção tecidual de área ao redor de lesões pré-neoplásicas (LPN) de animais tratados com água (controles) e de LPN de animais tratados com água (controles) ou AF durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese. p. 37

FIGURA 12 Avaliação da expressão hepática de *c-myc* especificamente em amostras obtidas por procedimento de microdissecção tecidual da área ao redor de lesões pré-neoplásicas (LPN) de animais tratados com água (controles) e de LPN de animais tratados com água (controles) ou AF durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese. p. 38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Valores garantidos pelo fabricante por quilograma de ração.	p. 14
TABELA 2	Quantidades adicionadas pelo fabricante por quilograma de ração.	p. 15
TABELA 3	Informações dos iniciados e condições utilizadas para amplificação pela técnica de PCR.	p. 28
TABELA 4	Pesos corpóreos inicial e final bem como pesos absoluto e relativo do fígado e o consumo de ração de ratos Wistar tratados com água (controles) ou AF durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese.	p. 31
TABELA 5	Análise macroscópica das LPN hepáticas observadas nos animais tratados com água (controles) ou AF durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese.	p. 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF: ácido fólico;

AOM: azoximetano;

BrdU: bromodesoxiuridina;

CBA: compostos bioativos dos alimentos;

CDKi: inibidores de quinases dependentes de ciclinas;

DAB: diaminobenzidina;

DEN: dietilnitrosamina;

1,2-DMH: dimetilhidrazina;

DMSO: dimetilsulfoxido;

2-AAF: 2-acetilaminofluoreno;

EPM: erro padrão da média;

GC: grupo controle;

GST-P: glutationa-*S*-transferase forma placentária;

HCC: hepatocarcinoma;

HR: hepatócito resistente;

FCA: focos de criptas aberrantes;

IARC: *International Agency for Research on Cancer;*

INCA: Instituto Nacional do Câncer;

LPN: lesões pré-neoplásicas;

MAT: metionina adenosiltransferase;

MTHFR: metileno-tetrahidro-folato-redutase;

ENNG: N-etil-N-nitrosoguanidina;

OMS: Organização Mundial da Saúde;

PCR: reação em cadeia da polimerase;

PMG_{DNA}: padrão de metilação global do DNA;

SAM: *S*-adenosil-metionina;

TCA: ácido tricloroacético;

SUMÁRIO

Pág.

1. INTRODUÇÃO 01

2. RESUMO DE LITERATURA 03

3. Objetivos 13

3.1 Objetivos Geral 13

3.2 Objetivos Específicos 13

4. MATERIAL E MÉTODOS 14

4.1 Animais 14

4.2 Modelo de Hepatocarcinogênese do HR 16

4.3 Protocolo Experimental 16

4.4 Eutanásia dos Animais 18

4.5 Exame Macroscópico 18

4.6 Exames Microscópicos 19

4.6.1 Análise morfométrica das LPN 19

4.6.2 Avaliação da proliferação celular 20

4.6.3 Avaliação da apoptose 20

4.7 Avaliação de danos no DNA hepático..... 21

4.8 Microdissecção de LPN hepáticas 23

4.9 Avaliação do Padrão Hepátco de Metilação Global do DNA (PMG_{DNA}) de amostras de LPN microdissecadas..... 25

4.9.1 Extração de DNA a partir de amostras de LPN microdissecadas 25

4.9.2 Dot-blot 26

4.10 Análise da Expressão do gene *c-myc* em amostras de LPN microdissecadas 26

4.10.1 Extração de RNA a partir de amostras de LPN 27

4.10.2 Amplificação do c-DNA por PCR 28

4.11 Análise Estatística 29

5. RESULTADOS 30

6. DISCUSSÃO .....……..... 39

7. CONCLUSÕES 46

8.REFERÊNCIAS 47

APÊNDICES

ANEXO

1. INTRODUÇÃO

O câncer de fígado é atualmente o quinto tipo mais comum e a terceira causa de morte por câncer no mundo. Estimou-se para o ano de 2007 aproximadamente 680.000 mortes por câncer de fígado, principalmente nos países em desenvolvimento (THUN *et al.,* 2010). Devido ao difícil tratamento e mau prognóstico, enfatiza-se que a prevenção, mais especificamente a quimioprevenção, consiste em importante medida para controle da doença (KENSLER *et al.,* 2003).

Atualmente, um dos assuntos mais discutidos na área da Nutrição é o potencial quimiopreventivo dos folatos (KIM, 1999; SANDERSON *et al.,* 2007). Estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de folato foi inversamente associada com o risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer (KIM, 1999; 2007a; b), incluindo o de fígado (WELZEL e*t al.,* 2007; KUO *et al.,* 2008). Apesar dessas evidências, estudos em animais mostraram que a suplementação com ácido fólico (AF) pode apresentar efeitos distintos dependendo da dose e da etapa da carcinogênese em que se inicia a suplementação (KIM, 2007a; b; SMITH *et al.,* 2008). Além disso, pouco se conhece a respeito da suplementação com essa vitamina durante as etapas iniciais pré-neoplásicas da carcinogênese. Dessa forma, estudos em animais avaliando os efeitos de diferentes doses de AF especificamente durante as etapas iniciais são necessários para o estabelecimento do momento de início e dosagem segura de AF a ser suplementada (KIM, 2007a).

Modelos de hepatocarcinogênese em ratos estão bem estabelecidos para o estudo da carcinogênese (SU; BANNASCH, 2003), uma vez que o desenvolvimento do hepatocarcinoma (HCC) em ratos é semelhante ao observado em humanos (BANNACH *et al.,* 2003). O modelo do “Hepatócito Resistente” (HR) tem como principal característica a produção de lesões pré-neoplásicas (LPN) e neoplásicas de forma sincronizada, o que o torna uma ótima ferramenta para o estudo de substâncias com potencial de modular a carcinogênese durante as etapas iniciais pré-neoplásicas (RIZZI *et al.,* 1997). Uma importante característica das LPN induzidas por esse modelo, observadas cerca de seis semanas após a iniciação com dietilnitrosamina (DEN), é o potencial destas apresentarem dois fenótipos distintos: remodelação espontânea a uma aparência de fígado normal por parte da maioria (95-98%), ou persistência, com proliferação celular e evolução para o câncer por parte da minoria (2-5%) das LPN.

Assim, baseado em estudos prévios desenvolvidos com animais suplementados com AF e submetidos à modelo de carcinogênese de cólon (revisados por KIM (2007 a, b)), o presente estudo apresenta e hipótese de que quando o tratamento com AF é iniciado antes do estabelecimento e se prolonga continuamente durante as etapas iniciais pré-neolpásicas da hepatocarcinogênese, essa vitamina apresenta atividade quimiopreventiva. Alem disso, como existem poucas evidências a respeito dos mecanismos celulares e moleculares de ação por parte dessa substância durante as etapas pré-neoplásicas da carcinogênese, se avaliou a proliferação celular, a apoptose, danos no DNA hepático bem como o padrão de metilação global do DNA e expressão do oncogene *c-myc,* especificamente nesses últimos dois casos, em LPN obtidas por procedimento de microdisseceção tecidual.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O câncer é conhecido desde as primeiras civilizações humanas. Todavia, pelo fato dessa doença se manifestar principalmente durante as últimas décadas de vida, até haver um aumento significativo da expectativa de vida, fato que ocorreu apenas na segunda metade do século XIX, o número de pessoas que alcançavam essa idade e, conseqüentemente, desenvolviam o câncer, era muito reduzido. Entretanto, atualmente, com a incidência das doenças infecto-parasitárias controladas pela melhoria do sistema de tratamento de água e esgoto, a proporção da população com potencial para desenvolver essa doença aumentou drasticamente (FRANKS; KNOWLES, 2005).

Apesar das doenças cardiovasculares ainda serem a principal causa de mortes, o câncer é considerado um importante problema de saúde pública em diversos países (JEMAL *et al*., 2006, THUN et *al.,* 2010). Nesse sentido, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (*International Agency for Research on Cancer* (IARC); órgão da Organização Mundial da Saúde (OMS)) estimou para o ano 2000 mais de 10.000.000 de novos casos e cerca de 6.000.000 de mortes por câncer no mundo (IARC, 2003). Já em 2005, o câncer foi responsável pela morte de 7.600.000 de pessoas, cerca de 13% do total de mortes no mundo, sendo os tipos com maior mortalidade o de pulmão (1.300.000), estômago (1.000.000), fígado (662.000), cólon (655.000) e mama (502.000). Vale a pena aqui ressaltar que desse número extremamente relevante de mortes por câncer em 2005, cerca de 70% dessas ocorreram em países de média ou baixa renda (WHO, 2006). Dados mais recentes estimaram para a população americana cerca de 1.500.000 novos casos e 560.000 mortes em decorrência do câncer somente em 2009 (JEMAL *et al*., 2009).

Apesar do cenário atual já ser bastante desanimador, estima-se que até 2020 ocorrerá um aumento de 50% na incidência de cânceres, sendo que desses, 1/3 poderá ser prevenido e 1/3 curável, desde que instituídas medidas para a educação da população quanto à mudança de seus hábitos comportamentais (WILKINSON, 2003). Alem disso, 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento (THUN et *al.,* 2010).

No Brasil, a incidência de câncer acompanha a tendência mundial. Nesse sentido, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para os anos de 2010 e 2011 cerca de 489.270 novos casos de câncer, sendo os tipos mais incidentes, exceção feita ao câncer de pele do tipo não-melanoma, os de próstata e pulmão em homens e mama e colo de útero em mulheres (INCA, 2010). De uma forma geral, as regiões Sul

e Sudeste apresentam maior incidência, enquanto as Norte e Nordeste, as menores. Estados da região Centro-Oeste apresentam incidência intermediária (INCA, 2010).

Carcinogênese é um termo geral utilizado para se denotar o desenvolvimento de neoplasias (PITOT, 2001). Essas podem ser benignas ou malignas. As primeiras se referem às que apresentam uma proliferação celular localizada e circunscrita, exercendo pressão nos tecidos adjacentes, mas que não ultrapassam suas divisas. Em contraste, neoplasias malignas ou cânceres têm a capacidade de invadir e se multiplicar em diferentes partes do organismo (HANNAHAN; WEINBERG, 2000). Já a definição de uma pré-neoplasia leva em conta etapas prévias do desenvolvimento de neoplasias tanto benignas quanto malignas. Dessa forma, uma pré-neoplasia não é idêntica a um pré-câncer, podendo ser descrita em nível histológico, como populações de células fenotipicamente alteradas e que não apresentam natureza neoplásica óbvia, mas que têm o potencial de progredir para neoplasias benignas ou malignas (BANNASCH *et al.,* 2003; FRANKS; KNOWLES, 2005).

Estudos com animais submetidos à carcinogênese de pele na década de 1940 mostraram que pelo menos três importantes eventos são necessários para o aparecimento do câncer (FRANKS; KNOWLES, 2005). A iniciação, primeiro estágio do processo, envolve alterações genéticas irreversíveis e permanentes na célula afetada (PITOT, 2001). Já na promoção ocorre a expansão clonal seletiva das células iniciadas pela ação de um agente promotor formando-se, assim, LPN (YOUNG *et al*., 2003). A progressão, último estágio, é caracterizada pela instabilidade cariotípica e por uma contínua evolução de características independentes, como mudanças bioquímicas nas células malígnas, aumento da proliferação celular, invasão e metástase (YOUNG *et al*., 2003).

Dessa forma, a carcinogênese consiste em um processo longo, requerendo para isso cerca de 20 a 40 anos, especialmente no caso de neoplasias em humanos (LOEB *et al*., 2003). Embora a natureza dos eventos relacionados a esse processo ainda não esteja completamente esclarecida, uma série de alterações genéticas e epigenéticas tanto em proto-oncogenes quanto em genes supressores de tumor ocorre durante a carcinogênese em diferentes órgãos (FRANKS; KNOWLES, 2005).

Muitos genes podem atuar como oncogenes quando expressos de forma aberrante ou quando mutados. Esses exercem suas funções de forma dominante e estimulam a proliferação celular e/ou previnem o processo de diferenciação celular normal. Essa característica de dominância apresentada pelos oncogenes os torna alvos

moleculares importantes para terapias contra o câncer (DRUKER; LYDON, 2000). Assim, destaca-se a importância de se avaliar o papel dos oncogenes durante as diferentes etapas da carcinogênese (NAGY *et al.,* 1988).

O oncogene *c-myc* exerce papel essencial na carcinogênese em diversos tumores humanos de diferentes origens. A proteína codificada por esse gene pertence a uma classe de proteínas nucleares que modulam a expressão de genes envolvidos com o controle da proliferação e diferenciação celular, apoptose, angiogênese e estabilidade genômica (PONZIELLI *et al.,* 2005; EILERS; EISENMAN, 2008). Assim, cânceres que apresentam hiperexpressão desse oncogene podem ser reconhecidos pela expressão dos genes codificados por *c-myc,* o que se descreve como "assinatura *c-myc*" (CAIRO *et al.,* 2008). De fato, demonstrou-se em células cujo c-*myc* encontrava-se ativado, o papel desse oncogene na progressão das fases G_0/G_1 para S do ciclo celular devido a regulação da expressão de genes fundamentais para o controle do ciclo celular como os inibidores das quinases dependentes de ciclina (CDKi) e ciclinas D1, D2, E1, A2 (MEYER; PENN, 2008).

Com relação a seu papel durante a hepatocarcinogênese, estudos prévios mostraram que a expressão desse oncogene encontra-se elevada inclusive já durante as etapas iniciais pré-neoplásicas do processo tanto em modelos em animais quanto em humanos (NAGY *et al.,* 1988; NIU *et al.,* 2002). Nesse sentido, descreveu-se recentemente a importância da "assinatura *c-myc"* para a evolução de LPN a neoplásicas hepáticas (KAPOSI-NOVAK *et al.,* 2009). Após a inativação de *c-myc,* células de hepatocarcinoma perdem suas características neoplásicas e se diferenciam em hepatócitos e colangiócitos (SHACHAF *et al.,* 2004). Assim, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que focam *c-myc* teria enorme impacto no tratamento de diferentes tipos de cânceres (PONZIELLI *et al.,* 2005). Além disso, dado seu papel já durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese (NAGY *et al.,* 1988; NIU *et al.,* 2002; KAPOSI-NOVAK *et al.,* 2009), vale a pena aqui ressaltar que a administração de substâncias capazes de inibir *c-myc* durante etapas pré-neoplásicas poderia constituir importante estratégia não apenas para o tratamento mas também para a quimioprevenção do câncer de fígado.

Descreve-se que o padrão de desenvolvimento da neoplasia maligna do fígado em ratos é semelhante ao que se observa em seres humanos (BANNASCH *et al.*, 2003; SU; BANNASCH, 2003). Dessa forma, modelos de hepatocarcinogênese química em ratos são considerados dentre os melhores para o estudo da gênese e desenvolvimento *in vivo* de neoplasias (SELL *et al.,* 1987; FARBER; SARMA, 1987).

Dentre os vários protocolos existentes para o estudo da hepatocarcinogênese, o modelo do HR, descrito em 1976 (SOLT; FARBER, 1976) e modificado em 1987 (SEMPLE-ROBERTS *et al*., 1987), está bem caracterizado e é suficiente para induzir elevada incidência de cânceres. Esse modelo tem como característica a produção de LPN e neoplásicas de forma sincronizada, possibilitando, desta forma, estudos mais detalhados, inclusive da quimioprevenção do câncer (OLIVEIRA *et al*., 2001).

Seu desenvolvimento baseou-se na hipótese, agora já bastante comprovada, de que diversos carcinogênicos químicos são capazes de produzir hepatócitos resistentes e um novo fenótipo constitutivo com um padrão bioquímico altamente característico, um fenótipo resistente, durante a etapa de iniciação do processo carcinogênico, caso ocorra pelo menos um ciclo de proliferação celular (FARBER; SARMA, 1987; LACONI *et al.*, 2000). Tais hepatócitos resistentes podem ser rapidamente estimulados de modo a formarem proliferações focais (focos e nódulos) após breve exposição a reduzidas concentrações de alguns carcinogênicos, como o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), associado a um estímulo mitogênico representado por uma hepatectomia parcial (SOLT; FARBER, 1976; LACONI *et al*., 2000). A grande maioria desses nódulos, cerca de 95-98%, sofre "*remodelação*", um processo altamente complexo envolvendo mudanças no suprimento sanguíneo, em características bioquímicas, bem como da estrutura e arquitetura celulares, retornando ao aspecto "normal" anterior do fígado. Uma pequena parte (2-5%) segue outro caminho, o da *persistência*. (TATEMATSU *et al*., 1983; FARBER; RUBIN, 1991; IMAI *et al*., 1997)

Justamente em nódulos persistentes de hepatócitos é que claramente se conseguiu demonstrar que estes atuam como locais de futura evolução para o câncer. Assim, nódulos persistentes são facilmente observados ao redor de sete meses após aplicação do agente iniciante, a DEN. Esses nódulos persistentes demonstram seqüência progressiva de evolução celular, com a ocorrência de "nódulos em nódulos" e, finalmente, aparecimento de câncer após cerca de 10-11 meses (FARBER, 1988).

Reconhece-se há décadas que muitas das alterações gênicas associadas ao câncer se originam a partir de ganho, perda ou mutação da informação genética. Porém, está se tornando cada vez mais claro que alterações epigenéticas também contribuem para o desenvolvimento de LPN e neoplásicas (WORM; GULDBERG, 2002; FEINBERG *et al.,*2006). Uma das principais modificações epigenéticas do genoma humano é a adição covalente de um

grupamento metil na posição 5´ do anel da citosina do dinucleotídeo CpG (ROBERTSON; JONES, 2000).

Existem dois tipos de alterações da metilação do DNA em cânceres humanos. No primeiro, genes são transcricionalmente silenciados devido a uma hipermetilação de sua região promotora (ROBERTSON; JONES, 2000; JONES; BAYLIN, 2007). Já no segundo, a quantidade de citosinas metiladas em nível genômico está reduzida em comparação a tecidos normais (tecidos não neoplásicos ou envelhecidos), estando esta hipometilação do DNA associada com um aumento da expressão gênica (ESTELLER, 2003).

A hipometilação do DNA constitui evento precoce na carcinogênese e está associada com instabilidade do DNA e com aumento de mutações (JONES; BAYLIN, 2002; POGRIBNY; BELAND, 2009). Alguns fatores como, por exemplo, a deficiência de folato, a ingestão elevada de etanol e a exposição a carcinogênicos químicos como DEN e 2-AAF induzem hipometilação no genoma (POIRIER, 2002; ROSS, 2003). Assim, especificamente durante a hepatocarcinogênese, observou-se hipometilação global do DNA (SIMILE *et al.,* 1994; CHEN *et al.,* 2004; TRYNDYAK *et al.,* 2006), bem como hipometilação com conseqüente aumento da expressão dos oncogenes *c-myc, c-Ha-ras* e *c-Ki-ras* durante as etapas iniciais pré-neoplásicas (SIMILE *et al.,*1994).

Ao contrário do silenciamento transcricional por modificações genéticas, eventos epigenéticos são potencialmente reversíveis, pois não interferem no conteúdo da informação dos genes afetados (FEINBERG, 2008). Assim, uma alteração do padrão de metilação do DNA poderia modificar a expressão gênica tanto em células pré-neoplásicas quanto neoplásicas (JONES; BAYLIN, 2007).

Atualmente, sugere-se que o padrão de metilação do DNA pode ser alterado por nutrientes envolvidos com o metabolismo dos grupos metil (CH_3) como, por exemplo, AF (DUNN, 2003; ROSS, 2003). Esse metabolismo é bastante complexo (**FIGURA 1**) e encontra-se relacionado tanto com o processo de síntese quanto de metilação do DNA. Basicamente, o AF ingerido é absorvido e bioconvertido a desidrofolato e, logo em seguida, a tetrahidrofolato. Posteriormente, em reação catalisada pela vitamina B6, essa substância é convertida a 5,10-metileno-tetrahidrofolato, o qual pode seguir três caminhos: i) ser convertido a 10-formil-tetrahidrofolato, co-fator para a síntese de purinas; ii) doar o CH_3 para o desoxiuridilato para a formação de desoxitimidilato, em reação catalisada pela enzima timidilato sintase; ou iii) em reação envolvendo a enzima metileno-tetrahidro-folato-

redutase (MTHFR), ser reduzido a 5-metil-tetrahidrofolato, necessário à síntese de metionina a partir da homocisteína. Assim, na presença de vitamina B12, ocorre a transferência do CH_3 do 5-metil-tetrahidrofolato para a homocisteína formando-se, então, metionina e tetrahidrofolato. Finalmente, em reação catalizada pelas enzimas metionina adenosiltransferase (MAT) e na presença de ATP, a metionina é ativada em *S*-adenosil-metionina (SAM), doadora universal de radicais CH_3 para diversos substratos, incluindo o DNA (LAMPRECHT; LIPKIN, 2003; KIM, 2007a; b).

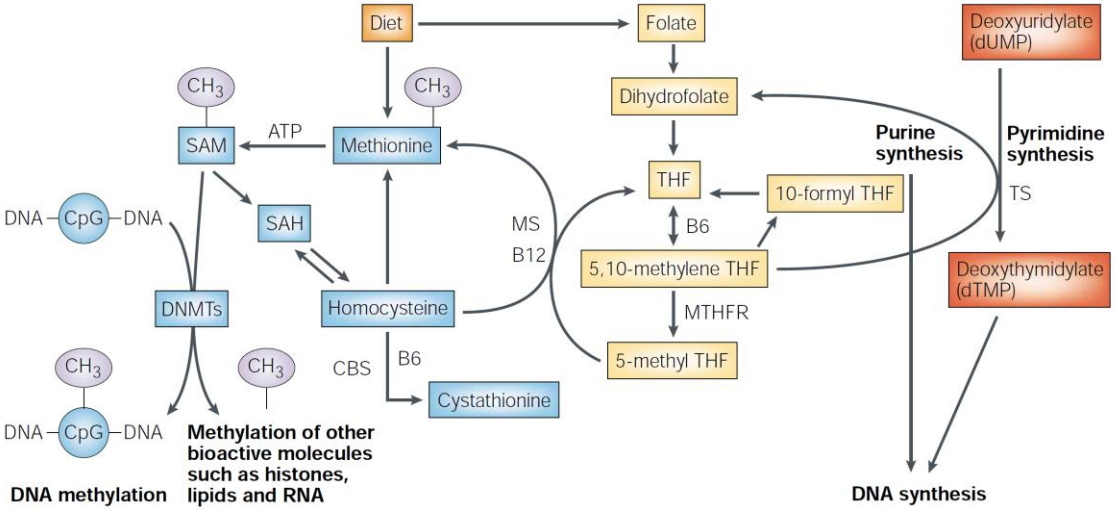


FIGURA 1. Visão geral do metabolismo dos grupamentos metil. Diet, alimentação; folate, ácido fólico; THF, tetrahidrofolato; 5,10-methylene THR, 5,10-metileno-tetrahidrofolato; B6, vitamina B6; 10-formyl-THF, 10-formil-tetrahidrofolato; MTHFR, metileno-tetrahidro-folato-redutase; 5-methyl THF, 5-metil-tetrahidrofolato; purine synthesis, síntese de purina; dUMP, desoxiuridilato; pyrimidine synthesis, síntese de pirimidina; TS, timidalato sintase; dTMP, desoxitimidalato, DNA synthesis, síntese do DNA; B12, vitamina B12; MS, metionina sintase; methionine, metionina; homocysteine, homocisteína; cystatione, cistationa; SAM, s-adenosil-metionina; SAH, s-adenosil-homocisteína; DNMTs, DNA metil transferases; CH3, grupamento metil; CpG, ilhas CpG; DNA methylation, metilação do DNA; methylation of other bioactive molecules such as histones, lipids and RNA, metilação de outras moléculas bioativas como histonas, lipídios e RNA. Figura retirada de Lamprecht e Lipkin (2003).

Descreve-se que a prevenção, destacando-se no caso, a quimioprevenção, seria o método mais apropriado para se eliminar o impacto do câncer em seres humanos (HONG; SPORN, 1997). Definida pela primeira vez por Sporn e colaboradores em 1976 (SPORN *et al.,* 1976) a quimioprevenção do câncer consiste na forma de se prevenir a doença por meio da administração de um ou mais

compostos químicos, sejam eles naturais ou sintéticos, durante as etapas iniciais pré-neoplásicas da carcinogênese, ou seja, antes do estabelecimento da fase de progressão (SPORN; SUH, 2002).

Utilizando o modelo de hepatocarcinogênese do HR, observou-se previamente efeitos protetores de diversos nutrientes e compostos bioativos de alimentos (CBA) em diferentes fases da carcinogênese. Nesse sentido, dentre diversos outros exemplos, observou-se efeito protetor por parte do β-caroteno quando administrado especificamente durante a iniciação (MORENO *et al.,* 1991), promoção inicial (RIZZI *et al.,* 1997) ou progressão (MORENO *et al.,* 2002). Já quando administrado continuamente durante a iniciação e promoção, observou-se ação quimiopreventiva digna de nota por parte do β-caroteno (MORENO *et al.,* 1991; 1995; FONSECA *et al.,* 2005; SAMPAIO *et al.,* 2007), vitamina A, ácidos retinóicos 9-*cis* e todo *trans* (FONSECA *et al.,* 2005; SAMPAIO *et al.,* 2007), β-ionona e geranilgeraniol (ESPÍNDOLA *et al.,* 2005), farnesol e geraniol (ONG *et al.,* 2006) e mais recentemente tributirina (KUROIWA-TRZMIELINA *et al.,* 2009).

Pelo fato do AF ocupar uma posição de destaque no metabolismo dos grupos CH_3, diversos estudos associaram esta vitamina ao câncer. A carcinogênese devida à deficiência de grupamentos CH_3 foi primeiramente descrita por Copeland e Salmon (1946), que utilizaram uma ração deficiente em metionina e folato. Posteriormente, foi definitivamente comprovado que rações sem metionina e colina atuam como carcinogênicos completos (MIKOL *et al.,* 1983; GHOSHAL; FARBER, 1984). Assim, existe um consenso de que rações deficientes em doadores de grupos CH_3 são suficientes para induzir câncer no fígado de ratos (LOMBARDI *et al.,* 1991).

Já com relação a seu potencial como agente quimiopreventivo, alguns estudos epidemiológicos mostram associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer, principalmente o de cólon, próstata, pâncreas, ovário e fígado (para mais informações, favor consultar apêndices). De uma forma geral, nos estudos em que se observou associação inversa entre o consumo de folato e o desenvolvimento de câncer, ressalta-se que isso ocorreu apenas com o consumo da vitamina oriunda da alimentação não sendo clara até o momento, ou em alguns casos ausente, associação inversa entre o consumo de suplementos a bases de AF ou entre o consumo de folato total (alimentação mais suplementação) e o risco de desenvolvimento do câncer.

No entanto, apesar das evidências supracitadas, estudos experimentais mostram que a dose e o momento de início do tratamento parecem ser críticos para o estabelecimento de efeitos quimiopreventivos (KIM, 2003; 2004; 2007a; 2007b; SMITH *et al.,* 2008).

Estudos utilizando modelo clássico de carcinogênese de cólon induzido pela dimetilhidrazina (1,2-DMH) em ratos, mostraram que a suplementação com AF (8 mg/Kg de ração), 4 vezes a quantidade recomendada para roedores, (2 mg/Kg de ração) antes da iniciação, retardou a progressão de lesões microscópicas para neoplasias (KIM *et al.,* 1996). Já a suplementação com AF em doses maiores do que 4 vezes a recomendação, não implicou em qualquer efeito benéfico. Na verdade, houve uma potencialização da carcinogênese de cólon em ratos suplementados com 40 mg de AF/Kg de ração (KIM *et al.,* 1996). Nesse sentido, a suplementação com AF da ordem de 1.000 vezes a recomendação (2 g/Kg de ração) em ratos iniciados com azoximetano (AOM, um metabólito da 1,2-DMH) resultou em aumento no número de FCA (focos de criptas aberrantes, consideradas LPN de cólon) em comparação ao grupo controle (2 mg/Kg de ração) (BIRD, 1995). Alem disso, observou-se redução do número de FCA em ratos iniciados com AOM e submetidos à deficiência de AF (LELEU *et al.,* 2000).

Posteriormente, Song e colaboradores (2000a) trataram camundongos que desenvolvem espontaneamente câncer de intestino delgado e cólon (camundongos *Min*; do inglês *Multiple Intestinal Neoplasia*) durante 3 ou 6 meses com diferentes doses de AF (0, 2, 8 ou 20 mg/Kg de ração). Assim, nos animais tratados durante 3 meses, os autores observaram uma redução ($p < 0,05$) de forma dose-dependente do número de FCA e de neoplasias ileais, mas não duodenais ou jejunais. Por outro lado, nenhum efeito foi observado nos animais tratados com AF durante 6 meses. Da mesma forma, utilizando outra linhagem de camundongos que também desenvolvem cânceres intestinais (camundongos *Apc* +/- *Msh2* -/-), observou-se que quando comparada ao grupo com restrição moderada de folato, a suplementação com essa vitamina (8 mg/Kg de ração), antes do estabelecimento de focos neoplásticos, reduziu significantemente o número de FCA, neoplasias intestinais e colônicas (SONG *et al.,* 2000b).

Também se observou efeito quimiopreventivo por parte do AF em modelo de carcinogênese gástrica induzida em cães e em ratos pela administração de N-etil-N-nitrosoguanidina (ENNG). Nesses estudos, os animais tratados com AF

apresentaram menor incidência de câncer de estômago em comparação ao grupo controle (XIAO *et al.,* 2002; FEI *et al.,* 2006).

Já em modelos de câncer de mama, a suplementação com AF (8 mg/Kg de ração por dia) especificamente durante a fase de iniciação ou promoção não resultou em qualquer efeito quimiopreventivo. Curiosamente, nesse modelo de carcinogênese, a deficiência dessa vitamina reduz significativamente a incidência e o tamanho dos adenocarcinomas de mama quando comparada aos grupos suplementados (KOTSOPOULOS *et al.,* 2005).

Assim, apesar do AF possuir algumas características de um agente quimiopreventivo promissor, a sua dose efetiva, o momento ideal para início da terapia bem como os tecidos beneficiados pelo tratamento com essa vitamina ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns estudos clínicos e experimentais sugerem que o AF pode aumentar o risco de desenvolver câncer e potencializar a carcinogênese se grande quantidade for administrada ou se a suplementação se iniciar após a presença de LPN no órgão alvo. Dessa forma, questiona-se se o tratamento com essa vitamina deve ser iniciado antes do estabelecimento dos FCA ou após o surgimento dessas lesões (KIM, 2004). Além disso, seu potencial como agente quimiopreventivo repercute no âmbito da saúde pública, uma vez que alguns países como os EUA, Canadá e Brasil adotaram o enriquecimento de alimentos com AF (KIM, 2003). Portanto, não se sabe até o momento o que pode ocorrer com indivíduos com LPN não diagnosticadas ingerindo AF de forma compulsória. Nesse sentido, vale a pena aqui ressaltar que já foi observado aumento da incidência de câncer de cólon no EUA e Canadá nos primeiros anos após a fortificação da farinha com AF (KIM, 2007b).

Alem disso, apesar dos estudos supracitados, pouco se conhece a respeito dos mecanismos celulares e moleculares modulados pelo AF durante a carcinogênese. Assim, estudos avaliando o efeito de diferentes doses dessa vitamina em modelos experimentais em que se pode distinguir claramente as etapas iniciais pré-neoplásicas como, por exemplo, o do HR, podem ser importantes para uma melhor compreensão a respeito do potencial quimiopreventivo dessa substância.

Apesar da relação entre a deficiência de folato e o câncer de fígado ser classicamente conhecida (JAMES *et al.,* 2003), até o momento não existem estudos disponíveis na literatura que avaliaram o efeito da suplementação com AF durante a hepatocarcinogênese. Todavia, estudos prévios utilizando ratos submetidos ao modelo do HR, mostram que o tratamento com SAM (produto formado no

metabolismo de transferência dos grupos metil) durante a fase de promoção reduziu a área das LPN (FEO *et al.,* 1985; PASCALE *et al.,* 1995; SIMILE *et al.,* 1996). Da mesma forma, a administração de SAM iniciada, porém, 10 semanas após a etapa de iniciação, diminui o número e o tamanho dos nódulos hepáticos (PASCALE *et al.,* 1995; SIMILE *et al.,* 1996). Em nível celular e molecular, essa substância reduziu a síntese de DNA, aumentou o número de LPN em remodelação (FEO *et al.,* 1985; SIMILE *et al.,* 1996), induziu a apoptose (GARCEA *et al.,*1989) e reduziu a expressão do oncogene *c-myc*. Alem disso, também no modelo do HR, recentemente se descreveu que a betaína (metabólito da colina também envolvida com o metabolismo dos grupos metil) reduziu o número e a área das LPN e a expressão de *c-myc* de forma dose-dependente (DU *et al.,* 2009). Assim, o AF, outro nutriente necessário a formação da SAM, poderia também regular importantes processos celulares e moleculares envolvidos com a hepatocarcinogênese (PASCALE *et al.,* 2002).

Dessa forma, o presente estudo foi conduzido para se avaliar o efeito da suplementação com diferentes doses de AF quando administrado continuamente durante as etapas de iniciação e seleção/promoção em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR. Considerando-se as evidências supracitadas, o presente estudo baseia-se na hipótese de que o AF, quando administrado continuamente durante as etapas iniciais pré-neoplásicas, apresenta atividade quimiopreventiva.

Alem disso, uma vez utilizando modelo sincronizado e bem estabelecido para o estudo da quimioprevenção do câncer, também se objetivou fornecer informações a respeito de alguns mecanismos de ação dessa vitamina. Nesse sentido, a fim de aumentar a precisão dessas análises e evitar a contaminação indesejada com as células vizinhas utilizou-se no presente estudo técnicas de imuno-histoquímica e de microdissecção tecidual associada àquelas de biologia molecular para se investigar o papel do AF em importantes eventos celulares e moleculares especificamente em LPN.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial quimiopreventivo do AF quando suplementado continuamente durante as etapas de iniciação e promoção em ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a proliferação celular hepática em LPN e no tecido ao redor dessas lesões em ratos Wistar submetidos ao modelo do HR, suplementados ou não com AF durante as etapas de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese;
- Avaliar a apoptose hepática em LPN e no tecido ao redor dessas lesões em ratos Wistar submetidos ao modelo do HR, suplementados ou não com AF durante as etapas de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese;
- Avaliar danos no DNA hepático de ratos Wistar submetidos ao modelo do HR, suplementados ou não com AF durante as etapas de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese;
- Avaliar o padrão hepático de metilação global do DNA (PMG_{DNA}) de LPN microdissecadas e no tecido ao redor dessas lesões em ratos Wistar submetidos ao modelo do HR, suplementados ou não com AF durante as etapas de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese;
- Avaliar a expressão hepática do oncogene *c-myc* de LPN microdissecadas e no tecido ao redor dessas lesões em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH, suplementados ou não com AF durante as etapas de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados no presente estudo ratos machos (n=60), albinos, da linhagem Wistar, com pesos iniciais compreendidos entre 50 e 60 g 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 (no máximo 5 ratos/gaiola) contendo maravalha trocada rotineiramente. Estes receberam *ad libitum*, água e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo/PR, Brasil). A ração era constituída de milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, gordura vegetal, premix vitamínico, mineral e de aminoácidos. Os níveis garantidos bem como os componentes adicionados por quilograma de produto pelo fabricante da ração encontram-se apresentados nas **TABELAS 1 e 2.**

TABELA 1. Valores garantidos pelo fabricante por quilograma de ração.

Componente	Quantidade
Umidade (máxima)	12,50%
Proteína bruta (mínimo)	22,00%
Extrato Etéreo (mínimo)	5,00%
Matéria mineral (máximo)	8,00%
Matéria fibrosa (máximo)	8,00%
Cálcio (máximo)	1,40%
Fósforo (mínimo)	0,60%

Fonte: http://www.sogorb.com.br/iframes/01-12-01.html.

TABELA 2: Quantidades adicionadas pelo fabricante por quilograma de ração.

Componente	Quantidade
Vitamina A	13.000 UI
Vitamina D3	2.000 UI
Vitamina B1	5,00 mg
Vitamina B12	22,00 µg
Vitamina B6	7,00 mg
Vitamina E	34,00 mg
Vitamina K3	3,00 mg
Niacina	60,00 mg
Biotina	0,05 mg
Ácido fólico	1,00 mg
Ácido pantotênico	21,00 mg
Colina	650,00 mg
Cobre	10,00 mg
Cobalto	1,50 mg
Ferro	50,00 mg
Iodo	2,00 mg
Manganês	60,00 mg
Selênio	0,05 mg
Zinco	60,00 mg
Lisina	100,00 mg
Metionina	300,00 mg

Fonte: http://www.sogorb.com.br/iframes/01-12-01.html.

Os ensaios biológicos foram realizados nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP em ambiente apropriado para condução de estudos de carcinogênese, com temperatura (22° C ± 2° C), luz (ciclo claro/escuro de 12 h) e umidade (70%) controladas.

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais de Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (processo CEEA-FCF/USP n° 122. Documento em anexo).

4.2 Modelo de Hepatocarcinogênese do HR

Para induzir LPN hepáticas nos animais, utilizou-se o modelo de hepatocarcinogênese do HR (SOLT; FARBER, 1976) adaptado para ratos Wistar conforme descrito por Moreno *et al.* (1991). Para tanto, os animais receberam, por via intraperitoneal, uma única dose (20 mg/100 g de peso corpóreo) do agente iniciante DEN (Sigma®) dissolvido em solução de NaCl a 0,9% autoclavada.

Após período de recuperação de 2 semanas, os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses de 2-AAF (Sigma®; 2 mg/100 g de peso corpóreo/dia) dissolvido em dimetilsufóxido (DMSO) e óleo de milho, em dias consecutivos, por intubação gástrica. Vinte e quatro horas após a última aplicação de 2-AAF os animais foram submetidos a um potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial a 70%, realizada como descrito por Higgins e Anderson (1931). Finalmente, no segundo dia após a cirurgia, os animais receberam 1 dose adicional de 2-AAF (Sigma®; 0,75 mg/100 g de peso corpóreo/dia).

4.3 Protocolo Experimental

Para avaliar o efeito quimiopreventivo do AF quando suplementado a ratos Wistar submetidos ao modelo do HR continuamente durante as etapas de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese, os animais foram submetidos aos procedimentos apresentados na **FIGURA 2**. Após um período de aclimatação de 7 dias, exceção feita a 9 animais que constituíram o grupo de ratos não submetido ao modelo de hepatocarcinogênese (grupo “Normal”), 51 animais foram submetidos ao modelo do HR (para mais informações, ver item **4.2**). Esses animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 diferentes grupos experimentais, cada um com 17 animais, a saber:

GC: os animais deste grupo receberam apenas o veículo utilizado para solubilizar o AF, ou seja, água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia), por intubação gástrica, diariamente, durante 8 semanas consecutivas até o dia da eutanásia. Este grupo serviu de controle para os demais grupos experimentais;

AF8: os animais deste grupo experimental receberam por intubação gástrica AF (Sigma®) na dosagem de 0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia, dissolvido em água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia), durante 8 semanas consecutivas até a eutanásia.

AF16: os animais deste grupo experimental receberam por intubação gástrica AF (Sigma®) na dosagem de 0,16 mg/100 g de peso corpóreo/dia, dissolvido em água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia), durante 8 semanas consecutivas até a eutanásia.

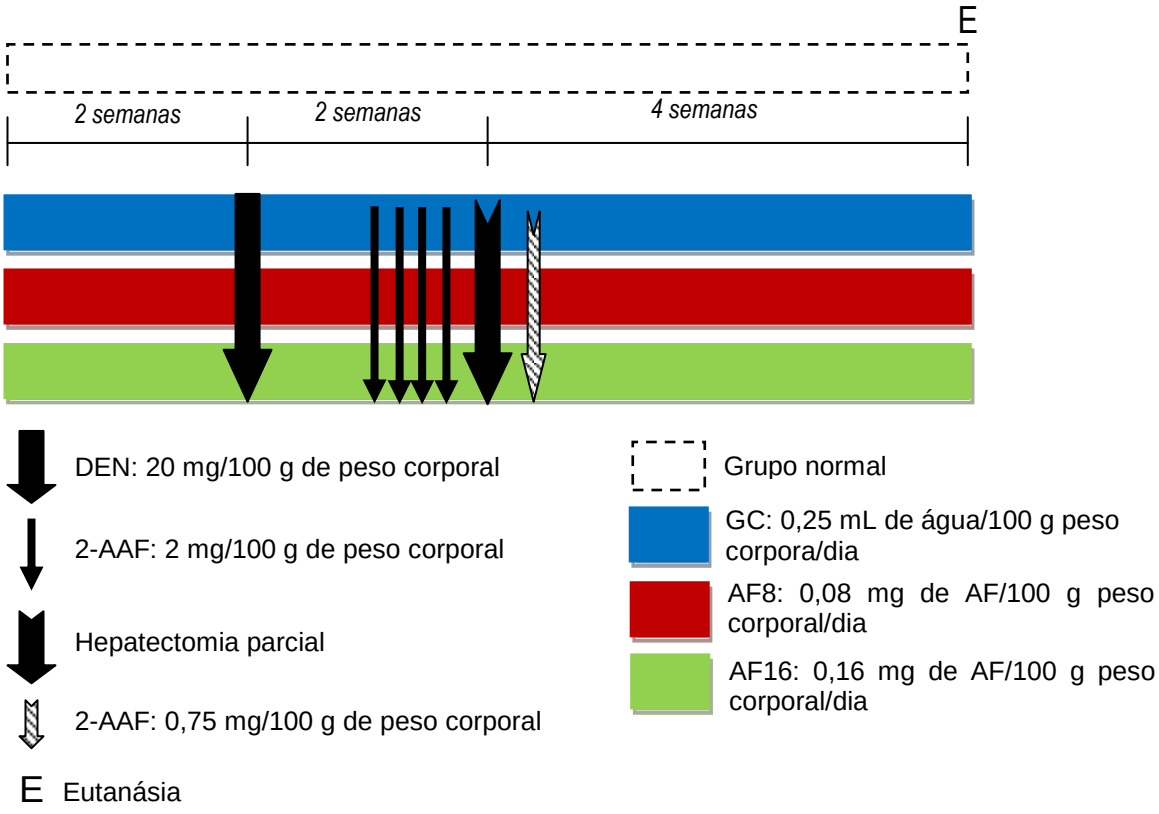


FIGURA 2. Delineamento experimental para avaliação do efeito quimiopreventivo do ácido fólico quando suplementado durante as etapas de iniciação e promoção a ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente". AF, ácido fólico; DEN, dietilnitrosamina; 2-AAF, 2-acetilaminofluoreno.

Duas horas antes da eutanásia dos animais, os animais receberam a última dose de AF e, alem disso, para a avaliação da proliferação celular, aplicou-se uma dose intraperitoneal de bromodesoxiuridina (BrdU,10 mg/100 g de peso corpóreo, dissolvida em solução salina tamponada com fosfato PBS (KCl, Na_2HPO_4, KH_2PO_4 e NaCl, pH = 7,4) e NaOH 1,0 N.

4.4 Eutanásia dos Animais

Por ocasião da eutanásia, os animais foram anestesiados com éter etílico (Merck®) procedendo-se, a seguir, à laparotomia. A eutanásia ocorreu por meio de secção da aorta abdominal e conseqüente choque hipovolêmico. Em seguida, foi retirado o fígado, seguindo-se, então, o exame macroscópico do mesmo.

4.5 Exame Macroscópico

O fígado de cada animal foi examinado individualmente quanto à presença, em sua superfície, de formações nodulares de coloração em geral esbranquiçada ou amarelada, que se distinguem do parênquima hepático. Essas formações, denominadas de LPN (BANNASCH; ZERBAN, 1990), foram classificadas pelo seu diâmetro em “< 1 mm” ou “≥ 1 mm”. Após o exame da superfície, cada lobo hepático foi seccionado em fatias de aproximadamente 0,3 cm de espessura, sendo, então, identificadas e contadas as LPN internas.

Posteriormente, foram colhidas de cada animal amostras de cada lobo de fígado para análises microscópicas. Estes fragmentos foram imediatamente fixados em metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) por aproximadamente 24 h.

Além disso, foram ainda colhidos fragmentos do fígado para posterior avaliação de danos no DNA e para a realização de procedimento de microdissecção de LPN hepáticas ou de tecido hepático ao seu redor. Tais fragmentos foram imediatamente

congelados, primeiramente, em hexano (Synth®) armazenado em gelo seco, em seguida, em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados em *freezer* a –80 °C (Revco®).

4.6 Exames Microscópicos

Para as análises microscópicas, foram obtidos cortes de aproximadamente 5 μm de espessura de cada lobo hepático. A seguir, estes fragmentos foram submetidos às técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina.

4.6.1 Análise morfométrica das LPN

Para avaliar o efeito quimiopreventivo do AF, cortes histológicos obtidos por ocasião do sacrifício dos animais foram submetidos à reação imuno-histoquímica para a enzima glutationa-*S*-transferase forma placentária (GST-P). O método utilizado foi o da avidina-biotina (HSU *et al*., 1981), empregando-se, para tanto, anticorpos policlonais anti-GST-P, utilizados na diluição de 1:1000, e anticorpos secundários biotinilados anti-imunoglobulinas de coelho, na diluição de 1:400. Estes últimos consistem em anticorpos anti-IgG conjugados à biotina.

Cada procedimento foi intercalado por lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os cortes histológicos fixados em metacarn foram desparafinizados e a peroxidase endógena bloqueada. Os cortes foram, então, incubados com os anticorpos primários, na diluição já mencionada, durante uma noite e a 4 °C em câmara úmida. Em seguida, eles foram incubados por 30 min. com o anticorpo secundário biotinilado, na diluição de 1:400. Posteriormente, foi aplicada uma solução substrato de peroxidase preparada imediatamente antes da utilização. Os cortes foram lavados em PBS por 5 min., contracorados com Hematoxilina e Eosina (H&E), desidratados e montados com resina sintética.

Para se quantificar as LPN (número, área e porcentagem do corte histológico ocupada por LPN) marcadas com GST-P, utilizou-se o sistema de análise de imagem

computadorizada Axio Vision (Carl Zeiss®). As LPN hepáticas foram classificadas como persistentes (com bordas e coloração homogênea) ou em remodelação (com bordas irregulares e coloração heterogênea em seu interior) conforme descrito previamente (FARBER; RUBIN, 1991; ENOMOTO; FARBER, 1982; IMAI *et al.,*1997; ESPÍNDOLA *et al.,* 2005; MAZZANTINI *et at.* 2008).

4.6.2 Avaliação da proliferação celular

Para avaliar a proliferação celular em LPN e no tecido hepático ao redor das lesões, utilizou-se conjunto de reagentes para dupla-marcação imuno-histoquímica (Double-Stain System, Dako®). Para tanto, após a desparafinização, a peroxidase endógena foi bloqueada. O primeiro anticorpo primário foi o monoclonal anti- BrdU, sendo diaminobenzidina (DAB) o seu substrato cromógeno. O segundo anticorpo primário foi o anticorpo policlonal anti-GST-p, para a marcação de LPN persistentes ou em remodelação, sendo o Fast-Red o seu substrato cromógeno. Após a montagem das lâminas, as mesmas foram lidas em microscópio (Axio Star Plus, Carl Zeiss®) acoplado a sistema de análise de imagens Axio Vision (Carl Zeiss®). A leitura das lâminas foi realizada varrendo-se toda a área dos cortes em objetiva de 40x. O resultado foi expresso como número de células marcadas para BrdU/mm^2 de área de LPN persistente, em remodelação ou tecido ao redor das mesmas (ONG *et al.,* 2006; MAZZANTINI *et al.,* 2008; KUROIWA-TRZMELINA *et al.,* 2009).

4.6.3 Avaliação da apoptose

Para a avaliação da apoptose, cortes histológicos previamente marcados para GST-p (ver item **4.6.1**) foram analisados em microscópio de fluorescência basicamente como descrito por Stinchcombe e colaboradores (1995). Para tanto, utilizou-se microscópio Axio Star Plus (Carl Zeiss®) com sistema de epifluorescência acoplado. O método baseia-se na observação de que corpúsculos apoptóticos apresentam intensa fluorescência da eosina em cortes histológicos de fígado corados com H&E

(STINCHCOMBE *et al*., 1995). A identidade da estrutura fluorescente foi confirmada por critérios morfológicos clássicos (GRASL-KRAUPP *et al.,* 1994), alternando-se o sistema para luz normal.

A área total dos cortes histológicos foi analisada utilizando-se objetiva de 40x. Os resultados foram expressos como o número de corpúsculos apoptóticos/mm^2 de área de LPN persistente, em remodelação ou tecido ao redor das mesmas (ONG *et al.,* 2006; MAZZANTINI *et al.,* 2008; KUROIWA-TRZMELINA *et al.,* 2009; CHAGAS *et al.,* 2009).

4.7 Avaliação de danos no DNA hepático

No presente estudo, a análise de danos no DNA hepático em amostras de fígado previamente armazenadas a -80 °C foi realizada utilizando-se o método do "cometa", em sua versão alcalina, conforme descrito previamente (ESPÍNDOLA *et al.* 2005; FONSECA *et al.,* 2005; ONG et *al.,* 2006). Essa metodologia recebe este nome devido ao aspecto semelhante à cauda de cometa devido à migração das fitas de DNA para fora do núcleo. Assim, a distância entre o núcleo e a extremidade da "cauda do cometa" apresenta uma relação com a intensidade de quebras na molécula de DNA (OLIVE *et al.,* 1990).

Inicialmente, os tecidos hepáticos foram homogeneizados delicadamente em 0,5 mL de PBS (KCl, Na_2HPO_4; KH_2PO_4, NaCl, pH=8,0) sob refrigeração em gelo e filtrados. Vinte μL da suspensão de células foram transferidos para um tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 100 μL de solução de agarose de baixo ponto de fusão a 0,8% a 40 °C. Em seguida, 120 μL desta suspensão de células em solução de agarose foram transferidos para uma lâmina de microscopia previamente coberta com uma solução de agarose a 0,5%, cobertos por uma lamínula e incubados por 5 min. a 4 °C. As células imobilizadas foram lisadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X 100, 1% n-lauril sarcosina, pH=10), por 1 h. no escuro.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes (10 min. cada), sendo a primeira com PBS e as outras duas com água bidestilada. Em seguida, as lâminas foram armazenadas em cuba de eletroforese horizontal contendo tampão de corrida

(3% NaOH 10 N e 1 M EDTA) no escuro por 20 min. com posterior separação das fitas de DNA por eletroforese (0,9 V/cm, 300 mA, 20 min. no escuro).

As lâminas foram, então, neutralizadas com 3 lavagens (5 min. cada) com solução de Tris (0,4 M, pH=7,5) seguida por uma lavagem com água bidestilada com posterior fixação com solução contendo 15% de TCA (ácido tricloroacético), 5% de $ZnSO_4$, 5% de glicerina e água bidestilada por 10 min., e novamente lavadas em água bidestilada por 1 min. e finalmente secas em estufa, por 20 min.

A coloração foi realizada utilizando-se as soluções A (Na_2CO_3 a 5% em água ultra-pura) e B (0,02% de $(NH_4)_2NO_3$, 0,02% de $AgNO_3$, 0,1% de ácido sílicotungstênico, 0,05% de formaldeído (37%) e água ultra-pura), as quais foram misturadas na hora da utilização (CERDA *et al.*, 1997). Decorrido o processo de secagem, as lâminas foram coradas (misturas das soluções A e B) por 15 min. sendo em seguida lavadas em água bidestilada por 1min. em solução de ácido acético por 5 min. e, finalmente, lavadas novamente em água bidestilada e colocadas para secar em estufa (50 °C). No presente estudo, optou-se por corar os cometas formados com nitrato de prata ao invés de com o carcinogênico brometo de etídio, devido às vantagens do método como, por exemplo, permitir o registro permanente do experimento e verificação independente dos resultados, além de evitar problemas associados à contaminação do ambiente com o carcinogênico ou à fluorescência, tais como seu decaimento (FONSECA *et al.,* 2005; ONG *et al.,* 2006).

A quantificação do tamanho dos cometas foi feita utilizando-se sistema de análise de imagem computadorizado. Este consiste de um microscópio (Carl Zeiss®, modelo Axio Star Plus) triocular com adaptador, ao qual se acopla câmera de vídeo (PixeLink®, modelo PLA662), conectada a um microcomputador equipado com sistema de análise de imagem Axio Vision (Carl Zeiss®). Foi avaliado o comprimento de 100 nucleóides por lâmina, com o auxílio de cursor. A viabilidade das células hepáticas foi determinada analisando-se as imagens após a eletroforese. Não foram considerados viáveis cometas com aparência de nuvem ou com cabeça muito pequena e cauda semelhante a balão (células em apoptose ou necrose). Assim, a viabilidade da suspensão de células foi considerada aceitável quando a freqüência desses cometas for inferior a 2% (BARBISAN *et al.,* 2003; FONSECA *et al.,* 2005; ONG *et al.,* 2006).

4.8 Microdissecção de LPN hepáticas

Visando-se a realização de experimentos envolvendo técnicas de biologia molecular sensíveis e capazes de amplificar o DNA ou RNA extraído, considera-se indispensável a microdissecção tecidual para se discernir adequadamente populações celulares, como as oriundas de tecidos pré-neoplásicos daquelas provenientes de tecido hepático normal ao seu redor (MAGGIONI *et al.*, 2000). Assim, foram obtidos cortes de 10 μm a partir de fragmentos de fígado armazenados a –80 °C, utilizando-se, para tanto, criostato 2.800N (Reichert Jung®, Alemanha) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), os quais foram montados em lâminas de vidro e imediatamente corados com H&E, bem como desidratados em gradiente de álcool/xilol, sendo todos os procedimentos realizados em condições livres de RNAse.

Para a microdissecção, foi utilizado um aparelho (MicroDissector modelo PPMD, Eppendorf® AG) acoplado a micromanipuladores motorizados controlados que possibilitam a movimentação tridimencional (TransferMan NK2, Eppendorf® AG), adaptados a um microscópio invertido triocular com platina mecânica, modelo Axiovert 40 C (Carl Zeiss®), que se baseia na utilização de uma agulha que oscila ultrassonicamente e de uma micropipeta piezo-direcionada (**FIGURA 3**), para a rápida microdissecção histológica e aspiração da amostra em uma só etapa.

Para isso, de acordo com as etapas descritas na **FIGURA 4**, os cortes histológicos foram inicialmente recobertos com 100 μL de xilol, localizando-se, em seguida, a área de interesse, que foi então circundada, e microdissecada após os devidos ajustes da freqüência e amplitude da agulha de microdissecção (de 25 a 55 kHz e de 0 a 2 μm). O xilol contendo as partículas de tecido geradas foi então aspirado pela micropipeta de aspiração acoplada a uma ponteira específica (GELoader com filtro MDS, Eppendorf®) que, devido a sua elasticidade característica evita lesões teciduais. Posteriormente, agora em seu modo de ejeção, a micropipeta transferiu a amostra para um tubo de microcentrífuga. Em seguida, o solvente foi totalmente evaporado por exposição das amostras a um concentrador a vácuo (Concentrator plus, Eppendorf® AG), por aproximadamente 30 min. Para compor a amostra de animais para a realização dos procedimentos de microdissecção tecidual e, posteriormente, de extração do DNA e RNA, adotou-se o critério de selecionar aqueles que mais representavam o comportamento do grupo experimental, ou seja, os que

apresentaram valor mais próximos dos obtidos pelo respectivo grupo experimental no que tange à análise morfométrica das LPN GST-P positivas.

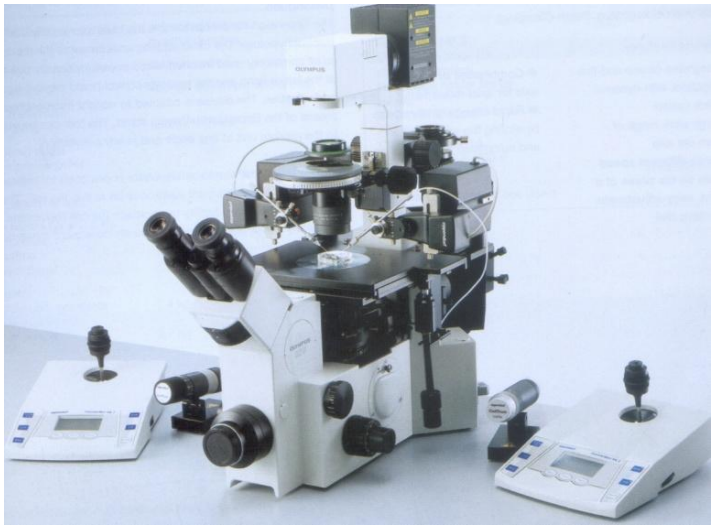


FIGURA 3. Foto do equipamento de microdissecção. Por meio da utilização de uma agulha oscilante o tecido para análise é fragmentado em partículas subcelulares, que são aspiradas para o interior da micropipeta.

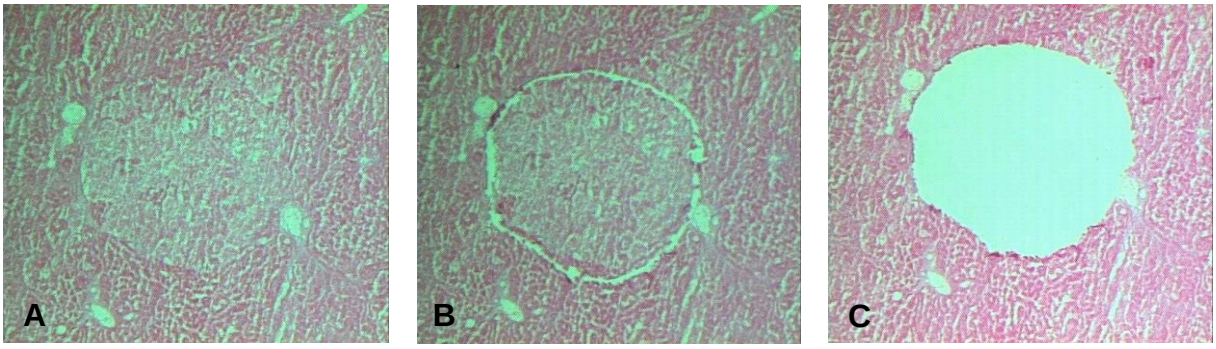


FIGURA 4. Fotomicrografias das etapas da microdissecção de LPN hepáticas coradas com H&E. **A:** LPN a ser microdissecada; **B:** Procedimento pré-microdissecção de contorno da LPN; **C:** Visualização do tecido hepático microdissecado. **A, B** e **C** obtidas com objetiva de 5x.

4.9 Avaliação do Padrão Hepático de Metilação Global do DNA (PMG_{DNA}) de amostras de LPN Microdissecadas

Para avaliar o PMG_{DNA} de amostras de LPN hepáticas obtidas por procedimento de microdissecção tecidual de ratos Wistar submetidos ao modelo do HR tratados ou não com AF utilizou-se a técnica de “dot-blot”. Para tanto, realizou-se os procedimentos descritos a seguir.

4.9.1 Extração de DNA a partir de amostras de LPN microdissecadas

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o método do fenol/clorofórmio/isopropanol (FU *et al*., 2003), no qual, amostras de LPN ou de área de tecido hepático ao redor destas (*surrounding*), foram submetidas à digestão por uma noite à 55 °C em de 500 μL de solução de tampão de digestão com proteinase K (20 mg/mL), RNAse (10 mg/mL). A seguir, foram adicionados 500 μL fenol-clorofórmio-isoamil (24:25:1, Invitrogen®) e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10-15 min., centrifugadas (956 *g*) por 15 min. a 4 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf® AG) e os sobrenadantes transferidos para microtubos de centrífuga (Phase lock gel heavy, Eppendorf® AG). Adicionou-se então às amostras 500 μL de clorofórmio/álcool isoamil (24:1) com posterior à agitação (10-15 min.), centrifugação (956 *g*) por 15 min. a 4 °C e nova coleta dos sobrenadantes. Após a adição de solução de 4% de acetato de sódio 3 M em etanol absoluto, os sobrenadantes foram incubados a -80 °C por dois dias. Finalmente, as amostras foram centifugadas (15.294 *g*) por 30 min. em temperatura ambiente e aos precipitados resultantes devidamente secos, adicionou-se 500 μL de etanol 70% e, em seguida, realizou-se uma nova centrifugação (15.294 *g*; 10 min.) com os precipitados obtidos eluídos em solução de TE (1 M Tris-Cl, 0,1 M EDTA, pH=8,0, Sigma®). Após o término do procedimento de extração, o DNA foi incubado a 65 °C por 30 min. para desativação das DNAses. Esse método possibilitou a obtenção de DNA de ótima qualidade, o qual apresentou integridade (razões na faixa de 1,9 - 2,0) e concentração

satisfatória (até 1,5 μg) (determinações realizadas no aparelho espectrofotomético Nanodrop® ND 1000 ThermoScientific do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP) para ser utilizado na avaliação do PMG_{DNA}.

4.9.2 Dot-blot

O DNA extraído de amostras de LPN e de tecido ao redor destas previamente obtidos por procedimento de microdisseção foi diluído em tampão SSC 10x, desnaturado com NaOH 0,1 N a 100 °C durante 5 min., aplicado em membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Bioscicence®), sob vácuo e submetido a subseqüente secagem e fixação em estufa a vácuo (80 °C por 2 h). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com solução de leite desnatado a 5% em PBS com Tween 20 0,1% (PBST) por 2 h., e então foi aplicado o anticorpo primário monoclonal anti-5-metilcitosina (1:1000, Serotec®, Reino Unido) diluído em solução de 0,5% de leite desnatado em PBS por 2 h. Em seguida, após 3 lavagens de 10 min. com PBST, as membranas foram tratadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:15000) diluído em solução de leite desnatado a 0,5% em PBS por 1 h. Finalmente, após 3 lavagens por 10 min. com PBST, procedeu-se a revelação da membrana utilizando-se o reagente ECL (Amersham Bioscience®). A intensidade do sinal foi determinada em unidades arbitrárias utilizando-se densitômetro ("Imaging Densitometer", Modelo GS-700, BIO-RAD®, EUA) com "software" específico (Molecular Analysis, BIO-RAD®). Para controle da aplicação das amostras de DNA, a membrana foi corada com azul de metileno como descrito previamente (TAO *et al.,* 2004; ONG *et al.,* 2006).

4.10 Análise da Expressão do Gene *c-myc* em amostras de LPN Microdissecadas

Para avaliar a expressão gênica de *c-myc* em amostras de LPN hepáticas obtidas por procedimento de microdissecção tecidual de ratos Wistar submetidos ao

modelo do HR tratados ou não com AF utilizou-se a técnica de RT-PCR. Para tanto, realizou-se os procedimentos descritos a seguir.

4.10.1 Extração de RNA a partir de amostras de LPN

A extração do RNA a partir de amostras de LPN e de *surrounding* obtidas por procedimento de microdissecção tecidual foi realizada utilizando-se o conjunto de reagentes denominado *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation* (GE Healthcare®) desenvolvido especificamente para extração de RNA a partir de quantidades reduzidas de tecido. Esse método tem por principais etapas a lise das células com simultânea inativação das RNAses seguida por filtragem, ligação do RNA a uma membrana de sílica, digestão do DNA, lavagens com tampões para remoção de sais, metabólitos e componentes celulares macromoleculares e, finalmente, eluição do RNA purificado em água livre de RNAses em condições de reduzidas forças iônicas.

A qualidade do RNA obtido foi monitorada examinando-se a integridade das bandas 28S e 18S de RNAs ribossomais, em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. Além disso, averiguou-se também a integridade e concentração do RNA utilizando aparelho espectrofotomético (Nanodrop® ND 1000 ThermoScientific do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP). Assim, observou-se que o RNA extraído apresentou ótima integridade (razões na faixa de 1,8 - 2,2) e concentração (até 1000 ng) satisfatória para ser utilizado na avaliação da expressão do gene *c-myc* por RT-PCR.

Dessa forma, realizou-se, posteriormente, a transcrição reversa a partir de 500 ng de RNA total, utilizando-se o conjunto de reagentes denominado *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®) que tem por principal objetivo a transcrição do RNA em cDNA, o qual apresenta estrutura passível de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.10.2 Amplificação do c-DNA por PCR

A análise da expressão gênica de *c-myc* a partir do RNA extraído de amostras de LPN ou de tecido ao redor das mesmas por meio de procedimento de microdissecção foi realizada por RT-PCR basicamente conforme descrito por Kim e colaboradores (2003).

Com um décimo do produto da transcrição reversa, prosseguiu-se à amplificação dos genes c-*myc* e *β-actina* (gene controle) de rato utilizando-se o conjunto de reagentes denominado *Platinum®Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®), nas seguintes condições: tampão para PCR 10x (5 µL), $MgCl_2$ 50 mM (1,5 µL), mistura de desoxinucleotídios 10 mM (1 µL), iniciador ("primer") 5' 10 µmol (1 µL); iniciador ("primer") 3' 10 µmol (1 µL) e enzima *Taq DNA Polimerase* 5 U/µL (0,4 µL) (Eppendorf®). Os iniciadores ("primers") utilizados encontram-se apresentados na **TABELA 3.**

Os cDNAs amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, a 80 V por aproximadamente 1,5 h. Em seguida, o gel foi exposto à luz UV e foi possível avaliar e fotografar as bandas obtidas e determinar sua intensidade por um sistema de análise de imagem baseado em densitometria ("Imaging Densitometer", Modelo GS-700, BIO-RAD®) com "software" específico (Molecular Analysis, BIO-RAD®). Os sinais foram quantificados em unidades arbitrárias e os dados obtidos normalizados em relação à expressão de *β-actina*.

TABELA 3. Informações dos iniciadores e condições utilizadas para amplificação pela técnica de PCR.

Gene	Tamanho do produto de amplificação	Iniciadores	Temperatura de associação (*annealing*)	Nº de ciclos
c-myc	422bp	5'-CAGCTGCCAAGAGGGCCAAGTTG-3' (sentido)[1] 5'-GTCAGAAGGAACCGTTCTCCTTACAC- 3' (anti-sentido)[1]	55,0 °C	30
β-actina	290bp	5'- GTTGCCATCAACGACCCCTTC- 3' (sentido)[2] 5'- GGATGCAGGGATGTTCTG- 3' (anti-sentido)[2]	59,3 °C	35

1) Seqüência descrita por Simile *et al.* (2005);
2) Seqüência descrita por Dhingra & Bansal (2006).

4.11 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).

Para a comparação entre os diferentes grupos experimentais, foi realizada a análise por ANOVA seguida pelo teste de Duncan, quando foram satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de análise de variância. Quando as condições supracitadas não foram atendidas, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Alem disso, utilizou-se também testes de comparação de médias para amostras independentes (teste *t* de student ou Mann Whitney) quando foram realizadas comparações entre os diferentes populações celulares (*surrounding* (área ao redor das LPN) com LPN) no mesmo grupo experimental, e o teste exato de Fisher para a comparação entre os diferentes grupos experimentais com relação à distribuição dos nódulos pré-neoplásicos observados à macroscopia.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa de computador STATISTICA em sua versão 8.0 (StatSoft). Os resultados encontram-se apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Em decorrência do estabelecimento do modelo do HR, alguns animais acabaram não resistindo aos procedimentos experimentais adotados e foram a óbito, principalmente por ocasião da administração da última dose de 2-AAF 2 dias após a hepatectomia parcial. Ao fim do experimento, 6 semanas após da iniciação com DEN, a mortalidade total foi de 15 animais. Assim, o número inicial de animais em cada um dos diferentes grupos experimentais, que inicialmente era de 17, foi reduzido a 10, 12 e 14 para os grupos GC, AF8 e AF16, respectivamente.

A **TABELA 4** apresenta os dados referentes aos pesos corpóreos inicial e final bem como os pesos absoluto e relativo dos fígados e o consumo de ração dos animais tratados durante 8 semanas consecutivas com água (grupo controle, GC) ou AF (grupos AF8 (0,08 mg de AF/100 g de peso corpóreo/dia) e AF16 (0,16 mg/100 g de peso corpóreo/dia)) e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os diferentes grupos experimentais em nenhum dos parâmetros analisados.

A **TABELA 5** apresenta os resultados referentes à análise macroscópica das LPN hepáticas observadas nos animais tratados diariamente durante 8 semanas consecutivas com água (GC) ou AF e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais no que se refere à incidência e número médio de LPN. Entretanto, o grupo AF16 apresentou maior ($p < 0,05$) porcentagem de nódulos menores do que 1 mm quando comparado àqueles apresentados pelo GC.

Os resultados da análise morfométrica (número, área e porcentagem do corte histológico ocupada) das LPN GST-P positivas tanto persistentes quanto em remodelação observadas nos animais tratados diariamente com água (GC) ou AF durante 8 semanas consecutivas e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR encontram-se apresentados nas **FIGURAS 5, 6 e 7**.

Quando comparado ao GC, o grupo AF8 não apresentou valores estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) com relação ao número, área e porcentagem da área ocupada tanto por LPN persistentes quanto em remodelação. Entretanto, também quando comparado ao GC, observa-se que o grupo AF16 apresentou menor ($p<0,05$) número de LPN persistentes e maior ($p < 0,05$) número de LPN em remodelação.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa (p > 0,05) foi observada entre os diferentes grupos experimentais com relação à área das LPN persistente e em remodelação. Entretanto, o grupo AF16 tendeu (p=0,07) a apresentar menor área do corte histológico ocupada por LPN persistentes em comparação ao GC.

TABELA 4. Pesos corpóreos iniciais e finais bem como pesos absolutos e relativos dos fígados e o consumo de ração de ratos Wistar tratados com água (controles) ou AF durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese.

Grupos	n	Peso corpóreo inicial (g)	Peso corpóreo final (g)	Peso absoluto do fígado (g)	Peso relativo do fígado (g/100g de peso corpóreo)	Consumo de ração (g/100g de peso corpóreo/dia)
Normal	8	59 ± 3	331 ± 27	9 ± 1	2,7 ± 0,1	10 ± 0,1
GC	10	60 ± 2	298 ± 18	9 ± 1	3,0 ± 0,2	10 ± 0,2
AF8	12	60 ± 2	290 ± 12	8 ± 1	2,7 ± 0,2	10 ± 0,2
AF16	14	60 ± 2	293 ± 11	8 ± 1	2,6 ± 0,2	10 ± 0,2

Resultados apresentados em média ± EPM. GC, animais tratados apenas com água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia, controles); AF8 animais tratados com AF (0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia); AF16, animais tratados com AF (0,16 mg/100 g de peso corpóreo/dia).

TABELA 5. Análise macroscópica das LPN hepáticas observadas nos animais tratados com água (controles) ou AF durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese.

Grupos	Ratos com LPN	Incidência de LPN (%)	Número médio de LPN	% de nódulos	
				<1 mm	≥1 mm
GC	10/10	100	60 ± 21	36	63
AF8	11/12	92	60 ± 18	64	36
AF16	11/14	79	22 ± 6	81[a]	19

Resultados apresentados em média ± EPM. GC, animais tratados apenas com água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia, controles); AF8 animais tratados com AF (0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia); AF16, animais tratados com AF (0,16 mg/100 g de peso corpóreo/dia). [a]) p<0,05 em comparação ao GC.

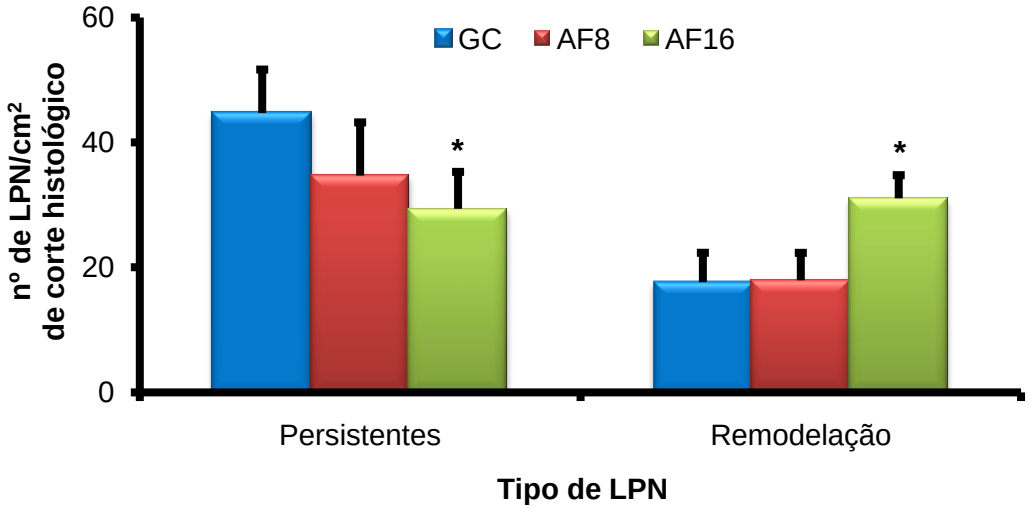


FIGURA 5. Número médio de LPN/cm^2 de corte histológico de ratos tratados com água (controles) ou AF durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese. LPN, lesões pré-neoplásicas; GC, animais tratados com água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia, grupo controle, n=10); AF8, animais tratados com AF (0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia, n=12); AF16, animais tratados com AF (0,16 mg/100g de peso corpóreo/dia, n=14). Resultados expressos em média ± EPM. * p<0,05 em comparação ao GC.

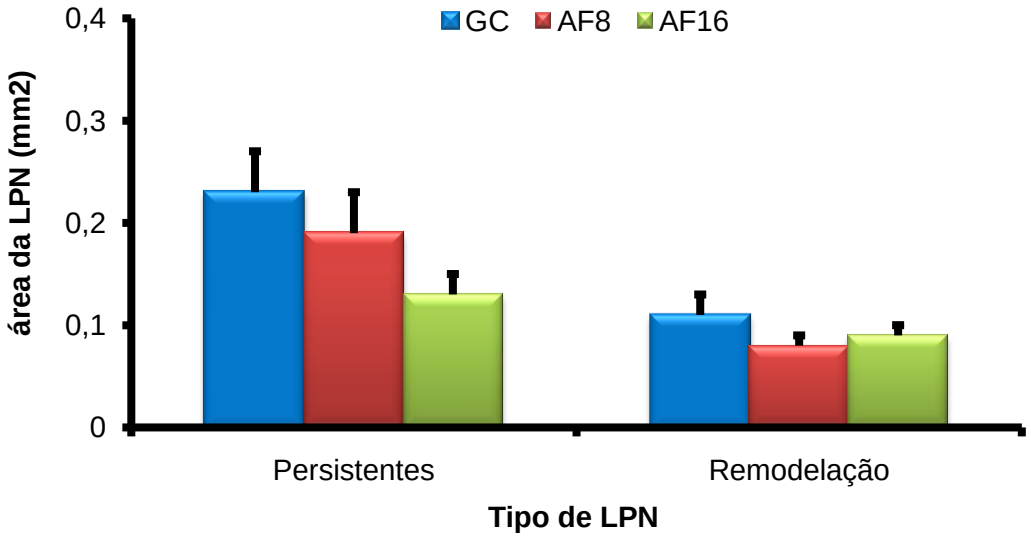


FIGURA 6. Área média das LPN/cm^2 de corte histológico de ratos tratados com água (controles) ou AF durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese. LPN, lesões pré-neoplásicas; GC, animais tratados com água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia, grupo controle, n=10); AF8, animais tratados com AF (0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia, n=12); AF16, animais tratados com AF (0,16 mg/100g de peso corpóreo/dia, n=14). Resultados expressos em média ± EPM.

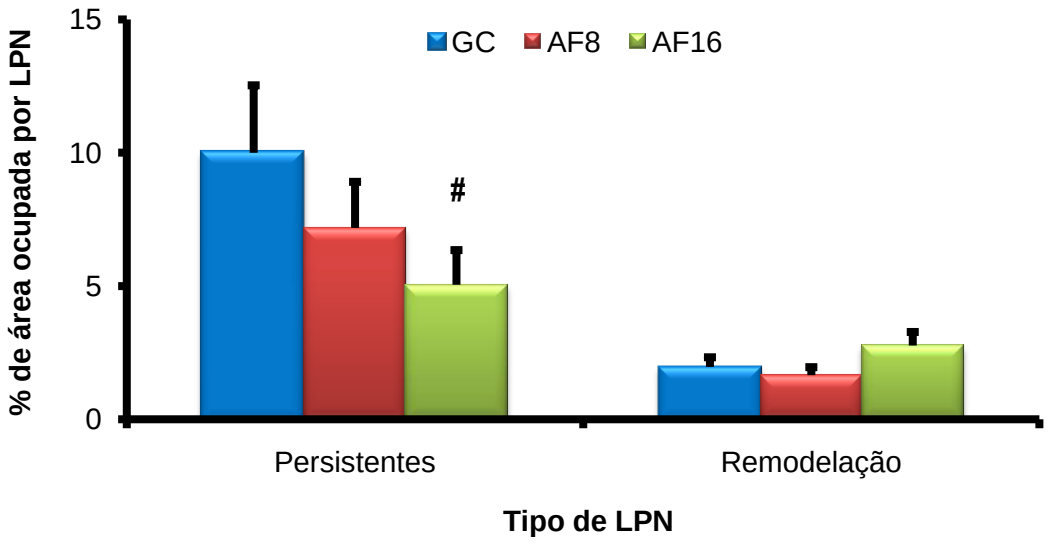
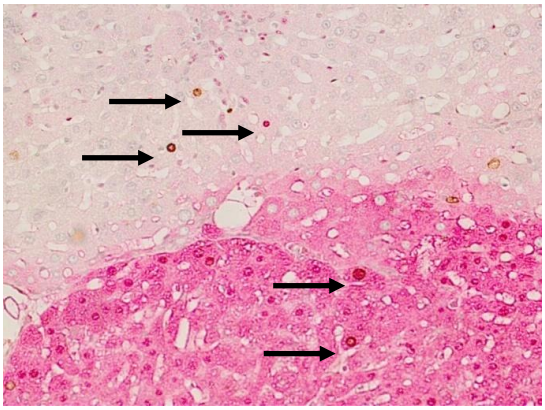


FIGURA 7. Porcentagem de área do corte histológico ocupada pelas LPN de ratos tratados com água (controles) ou AF durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese. LPN, lesões pré-neoplásicas; GC, animais tratados com água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia, grupo controle, n=10); AF8, animais tratados com AF (0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia, n=12); AF16, animais tratados com AF (0,16 mg/100g de peso corpóreo/dia, n=14). Resultados expressos em média ± EPM. [#]) p=0,07 (marginalmente significativo) em comparação ao GC.

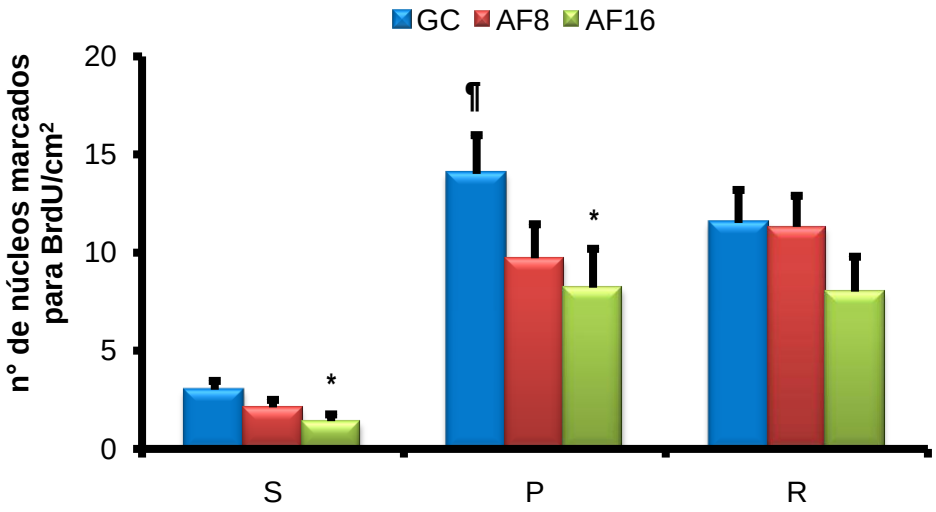
Os resultados referentes à avaliação da proliferação celular hepática de animais tratados diariamente com água (GC) ou AF durante 8 semanas consecutivas e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR encontram-se apresentados na **FIGURA 8**. Corroborando estudos prévios utilizando ratos submetidos ao mesmo modelo experimental adotado no presente estudo (FONSECA et *al.,*2005; ESPÍNDOLA *et al.,* 2005; ONG *et al.,*2006; MAZZANTINI *et al.,* 2008; KUROIWA-TRZMIELINA *et al.,* 2009), LPN persistente apresentam maior taxa de ($p<0,05$) proliferação celular quando comparado com à área ao redor das LPN (*surrounding*). Ao observarmos o *surrounding* e as LPN persistentes, constata-se que o grupo AF16 apresentou menor ($p < 0,05$) taxa de proliferação celular em comparação a observada no GC. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais nas LPN em remodelação.

Os resultados referentes à avaliação da apoptose hepática de animais tratados diariamente com água (GC) ou AF durante 8 semanas consecutivas e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR encontram-se apresentados na **FIGURA 9**. Corroborando estudos prévios utilizando ratos submetidos ao mesmo modelo experimental adotado no presente estudo (FONSECA *et al.,*2005; ESPÍNDOLA et *al.,* 2005; ONG *et al.,* 2006; MAZZANTINI *et al.,* 2008; KUROIWA-TRZMIELINA *et al.,* 2009), LPN persistentes

apresentam maior ($p < 0,05$) número de corpúsculos apoptóticos quando comparado à área ao redor das LPN (*surrounding*). Em comparação ao GC, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais tratados com AF no *surrounding* bem como em LPN persistentes e em remodelação.

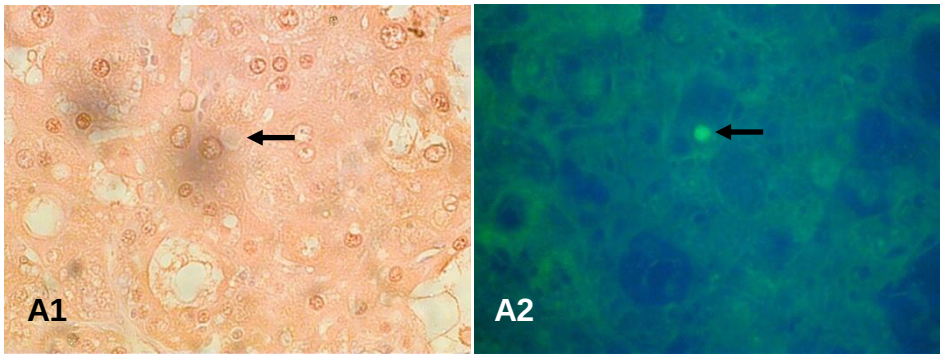


A

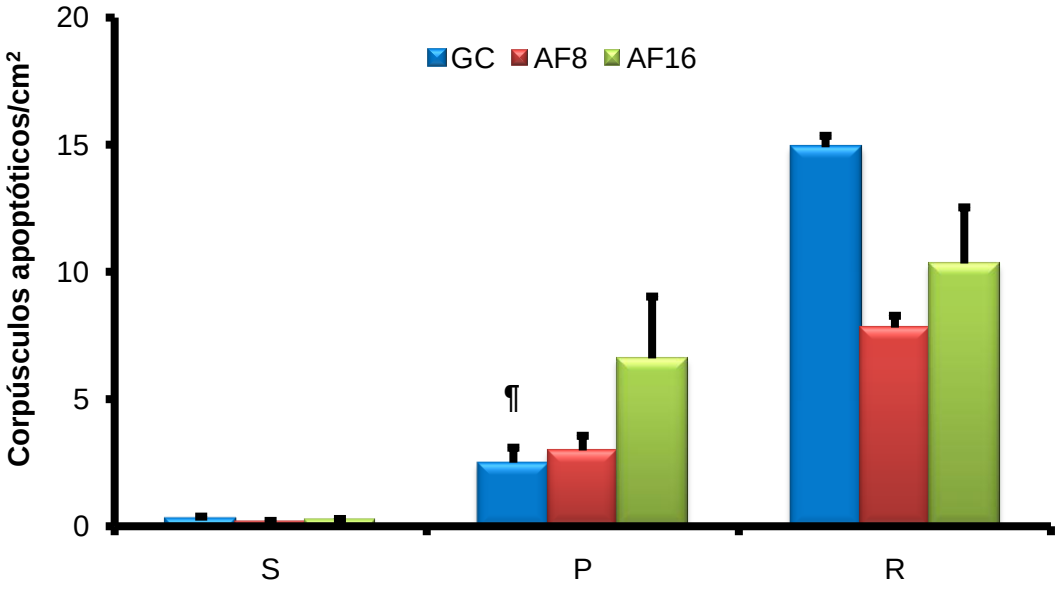


B

FIGURA 8. Avaliação da proliferação celular de ratos tratados com água (controles) ou AF durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese. **A)** Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato Wistar submetido ao modelo do RH. As setas indicam núcleos marcados positivamente pela bromodesoxiuridina (BrdU) no tecido ao redor de lesões pré-neoplásicas (LPN) e no interior de uma lesões pré-neoplásica GST-P positiva (área de coloração rósea). Foto obtida com objetiva de 20x. **B)** Avaliação da proliferação celular (nº de núcleos marcados para BrdU/cm^2 de área de corte histológico). GC, animais tratados com água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia, grupo controle, n=10); AF8, animais tratados com AF (0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia, n=12); AF16, animais tratados com AF (0,16 mg/100g de peso corpóreo/dia, n=14); S, tecido ao redor das LPN; P, LPN persistentes; R, LPN em remodelação. Resultados expressos em média ± EPM. ¶) $p<0,05$ em comparação à respectiva área ao redor das LPN (*surrounding*); *) $p<0,05$ em comparação ao GC.



A



B

FIGURA 9. Avaliação da apoptose de animais tratados com água (controles) ou AF durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese. **A)** Fotomicrografia de corpúsculos apoptóticos detectado em corte histológico de fígado de rato Wistar submetido ao modelo do RH e corado com H&E em luz normal transmitida (A1), e a mesma região do corte observada em microscopia de fluorescência (A2). As setas indicam os corpúsculos apoptóticos. Fotos obtidas com objetiva de 20x. **B)** Avaliação da apoptose (nº de corpúsculos apoptótico/cm^2 de área de corte histológico). GC, animais tratados com água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia, grupo controle, n=10); AF8, animais tratados com AF (0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia, n=12); AF16, animais tratados com AF (0,16 mg/100g de peso corpóreo/dia, n=14); S, tecido ao redor das lesões pré-neoplásicas (LPN); P, LPN persistentes; R, LPN em remodelação. Resultados expressos em média ± EPM. ¶), $p<0,05$ em comparação à respectiva área ao redor das LPN (*surrounding*).

Os resultados da avaliação de danos no DNA hepático de animais “normais” (não submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese) bem como de animais tratados diariamente com água (GC) ou AF durante 8 semanas consecutivas e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR encontram-se apresentados na **FIGURA 10.** Animais pertencentes ao GC apresentaram cometas de comprimento maior ($p < 0,05$) do que os animais “normais”. Já o grupo AF16 apresentou cometas menores ($p < 0,05$) do que aqueles observados no GC.

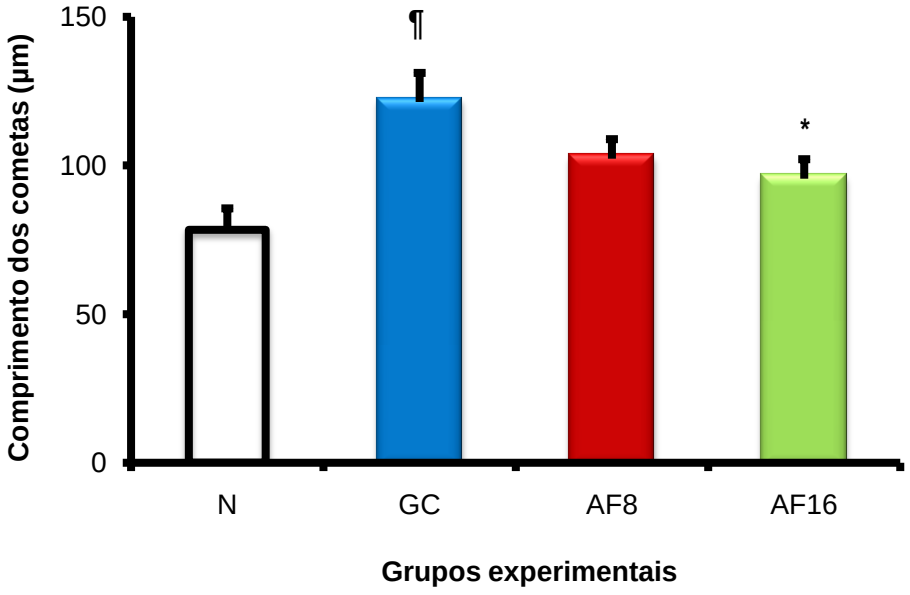
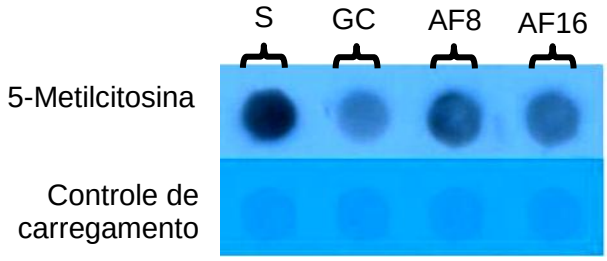
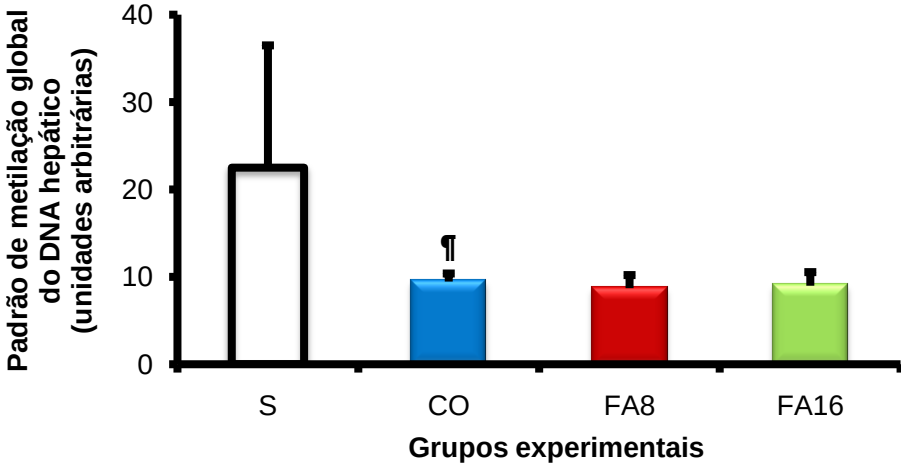


FIGURA 10. Avaliação de danos no DNA hepático de ratos tratados com água (controles) ou AF durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese. N, animais “normais” (não submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH (n=8); GC, animais tratados com água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia, grupo controle, n=8); AF8, animais tratados com AF (0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia, n=8); AF16, animais tratados com AF (0,16 mg/100g de peso corpóreo/dia, n=8). Resultados expressos em média ± EPM. ¶)$p<0,05$ em comparação à N; *)$p<0,05$ em comparação ao GC.

Os resultados referentes à análise do PMG_{DNA} especificamente de amostras obtidas por procedimento de microdissecção tecidual da área ao redor das LPN de animais tratados com água (GC) e de LPN de animais tratados com água (GC) ou AF diariamente durante 8 semanas consecutivas e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR encontram-se apresentados na **FIGURA 11**. LPN do GC apresentaram menor ($p < 0,05$) PMG_{DNA} quando comparada à respectiva área ao redor. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significante com relação ao PMG_{DNA} das LPN dos grupos AF8 e AF16 em comparação às LPN do GC.



A

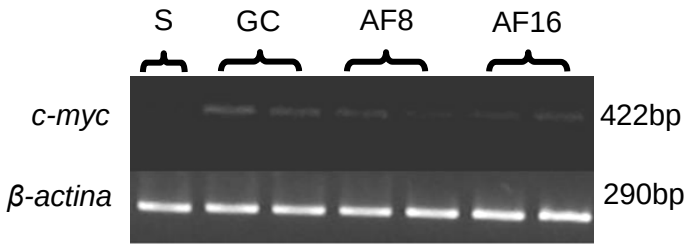


B

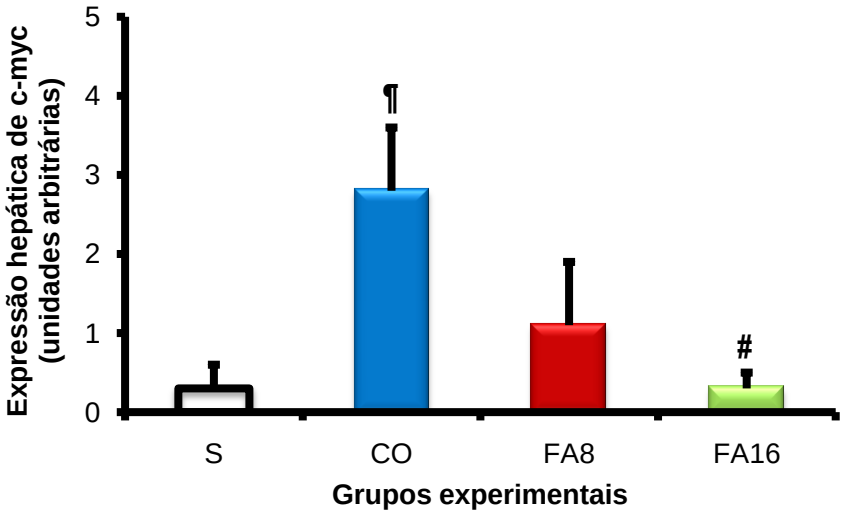
FIGURA 11. Avaliação do padrão de metilação global do DNA hepático especificamente de amostras obtidas por procedimento de microdissecção tecidual de área ao redor de lesões pré-neoplásicas (LPN) de animais tratados com água (controles) e de LPN de animais tratados com água (controles) ou AF durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese. S, área ao redor de LPN, *surrounding,* dos animais do grupo controle (n=2); GC, LPN de animais tratados com água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia, grupo controle, n=4); AF8, LPN de animais tratados com AF (0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia, n=4); AF16, LPN de animais tratados com AF (0,16 mg/100g de peso corpóreo/dia, n=4). **A)** Exemplo de autoradiografia mostrando as amostras de DNA marcadas pelo anticorpo anti 5-metilcitosina bem como a membrana corada com azul de metileno para controle de carregamento. **B)** representação gráfica do resultado. Resultados expressos em média ± EPM. ¶) $p<0,05$ em comparação ao S.

Os resultados referentes à expressão do oncogene *c-myc,* especificamente de amostras obtidas por procedimento de microdissecção tecidual da área ao redor das LPN de animais tratados com água (GC) e de LPN de animais tratados com água (GC) ou AF diariamente durante 8 semanas consecutivas e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR encontram-se apresentados na **FIGURA 12**. Quando comparada a respectiva área ao redor, LPN do GC apresentam maior ($p < 0,05$) expressão

de *c-myc.* Nota-se que, em comparação às LPN do GC LPN do grupo AF16 tenderam (p < 0,10) a apresentar menor expressão desse oncogene.



A



B

FIGURA 12. Avaliação da expressão hepática de *c-myc* especificamente em amostras obtidas por procedimento de microdissecção tecidual da área ao redor de lesões pré-neoplásicas (LPN) de animais tratados com água (controles) e de LPN de animais tratados com água (controles) ou AF durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese. S, área ao redor de LPN (*surrounding*) dos animais do grupo controle (n=2); GC, LPN de animais tratados com água (0,25 mL/100 g de peso corpóreo/dia, grupo controle, n=4); AF8, LPN de animais tratados com AF (0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia, n=4); AF16, LPN de animais tratados com AF (0,16 mg/100g de peso corpóreo/dia, n=4). Resultados expressos em média ± EPM. [¶]) p<0,05 em comparação a S; [#]) p<0,10 (marginalmente significativo) quando comparado ao GC.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se, de forma original, ação quimiopreventiva digna de nota por parte do AF quando suplementado continuamente durante as etapas de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese. Vale a pena aqui destacar a modulação de eventos celulares e moleculares importantes à carcinogênese hepática por parte dessa vitamina. Alem disso, os resultados aqui demonstrados, em conjunto com trabalhos prévios da literatura utilizando modelo de carcinogênese de cólon (KIM, 2003, 2004, 2007a; b; SMITH *et al*, 2008) confirmam a hipótese apresentada de que também na hepatocarcinogênese, a ação quimiopreventiva do AF, quando administrado antes da iniciação, parece depender da dose administrada.

As doses de AF utilizadas no presente estudo foram baseadas em estudos prévios (CRAVO *et al.*, 1992; KIM *et al.*, 1996; SONG *et al*., 2000a; b) nos quais se observou atividade quimiopreventiva em modelos de carcinogênese de cólon com ração suplementada da ordem de 4x (8 mg/Kg de ração) a recomendação para ratos (2 mg/Kg de ração (AIN-93)) e em experiências prévias de nosso grupo em que se observou que ratos Wistar consomem, em média, durante protocolos experimentais semelhantes ao adotado no presente estudo, 10 g de ração/100g de peso corpóreo/dia. Nesse sentido, vale a pena aqui ressaltar que no presente estudo, os animais consumiram durante as 8 semanas de experimento 10 g de ração/100 g de peso corpóreo/dia (**TABELA 4**). Assim, considerando-se que a ração comercial oferecida aos animais contempla a recomendação basal diária para ratos, os animais ingeririam em média durante o período experimental 0,02 mg de AF/100 g de peso corpóreo/dia. Dessa forma, com o objetivo de simular condição semelhante àquela utilizada nos estudos prévios (CRAVO *et al*., 1992; KIM *et al*., 1996; SONG *et al.*, 2000a; b), administrou-se, por intubação intra-gástrica, 0,08 mg/100 g de peso corpóreo/dia. Embora seja complicado fazer extrapolações entre a dose administrada em animais e aquela utilizada em humanos devido à diferença de metabolização dos folatos entre essas duas espécies (KIM, 2007 a; b), descreve-se que essa dose corresponderia a uma ingestão de aproximadamente 1,6 mg de AF/dia em humanos, o que reflete o consumo de indivíduos que vivem na América do Norte após a adoção da fortificação compulsória de alimentos com AF e que são tratados com 1 mg de AF/dia para determinados tratamentos médicos (SHANE, 2003). Além disso, para verificar o efeito de diferentes doses de AF durante as etapas iniciais pré-neoplásicas da

hepatocarcinogênese, utilizou-se também uma dose maior (0,16mg/100g de peso corpóreo/dia), correspondendo a 8x a recomendação para ratos.

Uma importante propriedade apresentada pelos focos e nódulos de hepatócitos induzidos pelo modelo do HR é a capacidade que estes têm de desenvolver dois fenótipos distintos. A maior parte deles, cerca de 95-98%, sofre remodelação espontânea para um tecido com características semelhantes ao do tecido hepático normal, enquanto que a minoria (2-5%), denominados persistentes, apresenta maior taxa de proliferação celular e evolui para o câncer (FARBER; SARMA, 1987). No presente estudo, vale a pena destacar não apenas a inibição do desenvolvimento das LPN persistentes, aquelas que descritas como precursoras do hepatocarcinoma (GARCEA *et al.*, 1989), mas também a indução da remodelação nos animais do grupo AF16 e não naqueles do grupo AF8, o que sugere uma ação dose dependente. Essa alteração no fenótipo das LPN representa de fato um relevante mecanismo celular associado à atividade quimiopreventiva do AF. De forma semelhante, a atividade quimiopreventiva por parte da SAM (GARCEA *et al.*, 1989), do β-caroteno, da vitamina A, do ácido retinóico 9-*cis* (FONSECA *et al.*, 2005) e da tributirina (KUROIWA-TRZMIELINA *et al.*, 2009) também envolve indução desse processo. Embora a remodelação também tenha sido observada durante a carcinogênese de cólon (BIRD; GOOD, 2000) e de mama (WOOD *et al.*, 2002), modelos em que a suplementação com AF já foi estudada (KIM *et al.*, 1996; SONG *et al.*, 2000a; b; KOTSOPOULOS *et al.*, 2005), é a primeira vez que se descreve que a ação quimiopreventiva dessa vitamina envolve esse mecanismo.

Descreve-se que o fenômeno da persistência, além de envolver aumento da proliferação celular, também pode ser reflexo de um bloqueio da remodelação, tanto por diferenciação (FARBER; SARMA, 1987) quanto por apoptose (SCHULTE-HERMANN *et al.*, 1990). Porém, até o presente momento, pouco se conhece a respeito dos mecanismos envolvidos com a persistência e remodelação de LPN. Existem evidências de que isso esteja relacionado com controle, em nível genômico (FARBER; SARMA, 1987), da expressão de genes envolvidos com proliferação e diferenciação celular (PASCALE *et al.*, 2002).

No presente estudo, animais do grupo AF16 apresentaram menor taxa de proliferação celular especificamente nas LPN GST-P persistentes. Já com relação à apoptose, nenhum efeito foi observado tanto em LPN GST-P persistentes quanto naquelas em remodelação. Assim, sugere-se que a indução da remodelação observada

no grupo AF16 possa estar associada com inibição da proliferação celular e ao processo de rediferenciação e não com a apoptose. De forma semelhante, a indução da remodelação de LPN hepáticas por parte do β-caroteno, da vitamina A, do ácido retinóico 9-*cis* também foi associada com a inibição da proliferação celular, e não com a apoptose (FONSECA *et al.*, 2005). Futuramente, poderia se instigar, nas condições do presente estudo, se o AF altera a expressão de genes envolvidos com o processo de diferenciação celular especificamente em LPN persistentes e naquelas em remodelação.

O AF é essencial à formação de bases purínicas e pirimidínicas necessárias à adequada formação do DNA. A incapacidade de sintetizar adequadamente as bases nitrogenadas é um fator limitante tanto para a síntese quanto para o reparo do DNA e está relacionada à estabilidade genômica (DUTHIE; HAWDON, 1998; BASTEN *et al.*, 2006). Assim, sugere-se que o AF, quando suplementado antes da iniciação da carcinogênese, poderia exercer seus efeitos protetores contra o câncer de cólon propiciando o reparo adequado do DNA e melhorando, dessa forma, a estabilidade genômica (KIM 2007a; b). Considerando-se os resultados apresentados na **FIGURA 10,** o tratamento com AF iniciado 2 semanas antes do estabelecimento do modelo de hepatocarcinogênese do HR pode ter sido importante para proteger os animais do grupo AF16 contra os danos genéticos decorrentes da administração dos agentes carcinogênicos DEN e 2-AAF. A deficiência de AF *in vitro* e *in vivo* foi associada com danos no DNA, instabilidade genômica e alterações no reparo do DNA enquanto que a sua suplementação poderia corrigir esses defeitos (KIM, 2007a). Da mesma forma, a suplementação com AF (1,2 mg/dia por 12 semanas) melhorou o reparo do DNA em linfócitos extraídos de humanos (BASTEN *et al.*, 2006). Assim, semelhantemente ao sugerido para a carcinogênese de cólon (KIM 2007a; b) a atividade quimiopreventiva do AF na hepatocarcinogênese pode envolver uma ação dessa vitamina em nível de reparo do DNA.

Atualmente, utilizam-se rotineiramente diversas metodologias para a identificação de biomarcadores moleculares, tanto para diagnóstico quanto para o prognóstico de doenças (FEND; RAFFELD, 2000). Todavia, alguns fatores como, por exemplo, a quantidade de células adjacentes à região de interesse, pode ser crucial para a interpretação dos resultados obtidos. Nesse sentido, para uma avaliação molecular específica de LPN, considera-se importante a microdissecção tecidual para se discernir adequadamente populações celulares oriundas de tecidos pré-neoplásicos daquelas provenientes de tecido hepático normal ao seu redor (MAGGIONI *et al.,* 2000).

Portanto, a combinação de técnicas sensíveis de Biologia Molecular com as de microdissecção tecidual, é necessária para o estudo dos aspectos moleculares em populações celulares específicas (FEND; RAFFELD, 2000).

Classicamente, descreve-se que o desenvolvimento do câncer compreende um processo progressivo envolvendo múltiplas etapas nas quais células normais são transformadas em malignas, principalmente devido a insultos genéticos (HANAHAN; WEINBERG, 2000; VOLGESTEIN; KINZLER, 2004). Todavia, estudos mais recentes indicam também a importância dos processos epigenéticos durante as diferentes etapas da carcinogênese; dessa forma, reconhece-se atualmente o câncer não apenas como doença de características genéticas, mas também epigenéticas (JONES; BAYLIN, 2007). Essas modificações são essenciais para o desenvolvimento e manutenção das funções celulares no organismo e encontram-se associadas com diversos processos fisiopatológicos incluindo o câncer (POGRIBNY; BELAND, 2009). A maior parte das pesquisas nesta área do conhecimento é focada principalmente no estudo dos mecanismos envolvidos com a hipermetilação de genes tanto em processos fisiológicos, como o envelhecimento (FRAGA; ESTELLER, 2007), quanto em condições patológicas, como o câncer (GRONBAEK *et al*., 2007), sendo muito mais escassos estudos relativos à hipometilação global do DNA durante as diferentes fases da carcinogênese.

A hipometilação global do DNA foi a primeira alteração epigenética a ser observada em células neoplásicas (POGRIBNY; BELAND, 2009). Esse processo consiste em um estado em que o padrão de metilação encontra-se abaixo do considerado “normal”, ou seja, menor do que o observado em tecido não neoplásico ou envelhecido (DUNN, 2003). Diversos cânceres humanos, dentre eles o de fígado (LIN *et al*., 2001), apresentam hipometilação em seu genoma. Além disso, existe uma associação entre o grau de hipometilação e o estágio de desenvolvimento do tumor, o que fortalece seu uso como um biomarcador para diagnóstico da doença (WIDSCHWENDTER *et al.*, 2004; NAKAGAWA *et al*., 2005; CALVISI *et al.*, 2007; WATTS *et al.*, 2008; KIM *et al.,* 2009a). Alterações no metabolismo da SAM pela deficiência crônica de nutrientes específicos (folato, colina e vitaminas B2, B6, B12), consumo de etanol ou exposição a agentes carcinogênicos como DEN e 2-AAF (utilizados no modelo do HR) implicam em alterações no PMG_{DNA} hepático (POIRIER, 2002; DUNN, 2003; ROSS, 2003; POGRIBNY; BELAND, 2009).

Logo de início, vale a pena aqui ressaltar que, embora descrita para avaliar o PMG_{DNA} em ratos submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon (TAO *et al.*, 2004), a técnica de "Dot-blot" mostrou-se adequada para avaliação do PMG_{DNA} nas presentes condições experimentais em que a quantidade de DNA é escassa devido ao procedimento de microdissecção tecidual. Alem disso, os resultados apresentados na **FIGURA 11** confirmam estudos prévios que mostraram, por outras metodologias, que a hipometilação do DNA consiste em evento precoce na hepatocarcinogênese (SIMILE *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2004; TRYNDYAK *et al.*, 2006).

No presente estudo, a suplementação com AF em ambas as dosagens utilizadas não reverteu a hipometilação do DNA observada nas LPN microdissecadas do GC. O presente estudo é o primeiro a avaliar o efeito da suplementação com AF no PMG_{DNA} especificamente em LPN durante as etapas inicias da hepatocarcinogênese Também por "dot-blot", observou-se que a atividade quimiopreventiva da metionina quando administrada por 44 semanas durante a hepatocarcinogênese induzida pelo ácido dicloroacético (carcinógeno não-genotóxico) em camundongos envolve reversão da hipometilação do DNA (PEREIRA *et al.*, 2004). Considerando os resultados do presente estudo (**FIGURA 11**), sugere-se que a atividade quimiopreventiva do AF quando administrado durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese não envolve alteração do PMG_{DNA}. Resultados semelhantes foram observados durante a carcinogênese química de cólon induzida pela 1,2-DMH, em que, apesar da atividade quimiopreventiva, não se observou alteração no PMG_{DNA} após a suplementação de ratos com AF (8 mg de AF/Kg de ração/dia) (KIM *et al.*, 1996). Com o objetivo de investigar com mais detalhes o papel dessa vitamina na modulação dos eventos epigenéticos, futuros estudos poderiam analisar o efeito da suplementação com AF no PMG_{DNA} e no padrão de metilação de genes supressores de tumor e histonas em diferentes modelos e/ou fases da hepatocarcinogênese, como nas condições em que se observou ação quimiopreventiva por parte da metionina (PEREIRA *et al.*, 2004).

Sabe-se que a hiperexpressão de oncogenes ocorre precocemente em diferentes tipos de câncer inclusive no de fígado (DUNN, 2003). Nesse sentido, recentemente se demonstrou em humanos a importância dos genes controlados pelo oncogene *c-myc* para a evolução de LPN em HCC (KAPOSI-NOVAK *et al.*, 2009). Assim, a modulação da expressão de *c-myc* poderia ser relevante à persistência de LPN hepáticas, já que essas são consideradas lesões precursoras do hepatocarcinoma (GARCEA *et al.*, 1989). No presente estudo, quando comparado ao respectivo tecido ao

redor, observou-se que LPN microdissecadas apresentam hiperexpressão de *c-myc.* Esses resultados reforçam o contexto de que esse oncogene representa uma importante alteração molecular já em fases iniciais do processo (NAGY *et al*., 1988; GARCEA *et al.,* 1989; SIMILE *et al.,* 1994). Alem disso, LPN microdissecadas de animais do grupo AF16 tenderam a apresentar menor expressão de *c-myc* em comparação aquela observada em LPN obtidas de animais do grupo CG. Apesar do resultado ser considerado como marginalmente significativo ($p < 0,10$) sob a óptica da estatística, é a primeira vez que se observa que alguma substância quimiopreventiva reduz a expressão de *c-myc* especificamente em tecido pré-neoplásico durante as etapas iniciais da carcinogênese hepática. Resultados semelhantes, porém utilizando amostras de tecido hepático total (LPN e área ao redor das LPN), foram descritos durante a prevenção da hepatocarcinogênese com SAM (GARCEA *et al.*, 1989; SIMILE *et al.*, 1994; PASCALE *et al.*, 2002) e betaína (DU *et al*., 2009), o que sugere que esse oncogene pode constituir alvo molecular importante para agentes quimiopreventivos do câncer de fígado.

Apesar dos resultados apresentados no presente estudo encorajarem a utilização do AF como um agente quimiopreventivo promissor, não se pode ignorar estudos experimentais prévios mostrando que a dose caracterizada como importante para proteção contra um determinado câncer pode exercer efeitos completamente paradoxais quando utilizada em outra etapa da carcinogênese ou em animais submetidos a diferentes modelos de carcinogênese. Além disso, vale a pena aqui ressaltar que o presente estudo apresenta como principal limitação o fato de ter avaliado o efeito da suplementação com AF simultaneamente com a administração dos carcinogênicos DEN e 2-AAF. Assim, não se pode excluir a possibilidade de que a ação quimiopreventiva observada possa, ao menos em parte, ser reflexo de uma modulação do metabolismo de xenobióticos. Dessa forma, o AF poderia ter agido alterando atividade de enzimas de fase 1 e/ou 2, o que ocasionaria uma inibição da biotransformação e/ou aumento da excreção dos carcinógenos, como recentemente descrito (CANISTRO *et al.*, 2008).

Embora classicamente considerada como uma vitamina com baixa ou nenhuma toxicidade, pouco ainda se conhece sobre o comportamento de seu metabolismo em situações fisiopatológicas como, por exemplo, o câncer. Portanto, sugere-se que os profissionais de saúde privilegiem fontes naturais de folato (as quais são consideradas mais seguras e inversamente associadas com o risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer – ver apêndices) e tenham cautela ao prescrever a forma sintética de

folato, principalmente quando cronicamente e/ou em indivíduos predispostos ao câncer de diferentes origens e tecidos, uma vez que o diagnóstico de LPN em diversos órgãos em humanos ainda não está bem estabelecido. Dessa forma, para uma correta utilização dessa vitamina seja no âmbito de saúde pública quanto no clínico, sugere-se a avaliação de cada situação fisiológica e/ou fisiopatológica utilizando-se para tal propósito ferramentas de análise do consumo e de funcionalidade metabólica para a avaliação do estado nutricional e de necessidades não apenas de folato, mas dos diversos outros nutrientes como colina, vitaminas B2, B6 e B12 também envolvidos nessa complexa rota bioquímica necessária a fisiologia de diferentes tecidos. Isso é ainda mais relevante em países como o Brasil que adotam a fortificação compulsória com AF.

7. CONCLUSÕES

- A suplementação com AF durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese em ratos resultou em atividade quimiopreventiva de forma dose-dependente;

- Alteração do fenótipo das LPN, redução dos danos no DNA, redução da proliferação celular e da expressão de *c-myc* especificamente em LPN microdissecadas representam importantes mecanismos celulares e moleculares associados com a atividade quimiopreventiva do AF;

- A indução da apoptose e a reversão da hipometilação global em LPN não representam mecanismos associados com a atividade quimiopreventiva do AF.

8. REFERÊNCIAS

BANNASCH, P.; ZERBAN, H. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tomours of the liver. *IARC Sci Publ.* 1990; 99:199-240.

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

BARBISAN, L. F.; SCOLASTICI, C.; MIYAMOTO, M.; SALVADORE, D. M.; RIBEIRO, L. R.; DaEIRA, A. F.; CAMARGO, J. L. Effects of crude extracts of Agaricus blazei on DNA damage and rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Genet. Mol. Res.* 2003; 2: 295-308.

BASTEN, G. P.; DUTHIE, S. J.; PIRIE, L.; VAUGHAN, N.; HILL, M. H.; POWERS, H. J. Sensitivity of markers of DNA stability and DNA repair activity to folate supplementation in healthy volunteers. *Br. J. Cancer*. 2006; 94:1942-1947.

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

BIRD, R. P.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol. Lett.,* 2000; 112-113: 395-402.

CAIRO, S.; ARMENGOL, C.; De REYNIES, A.; WEI, Y.; THOMAS, E.; RENARD, C. A.; GOGA, A.; BALAKRISHAMAN, A.; SEMERARO, M.; GRESH, L.; PONTOGLIO, M.; STRICK-MARCHAND, H.; LEVILLAYER, F.; NOUET, Y.; RICKMAN, D.; GAUTHIER, F.; BRANCHEREAU, S.; BRUGIERES, L.; LAITHIER, V.; BOUVIER, R.; BOMAN, F.; BASSO, *et al.* Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/β-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell.* 2008; 14: 471-484.

CALVISI, D. F.; SIMILE, M. M.; LADU, S.; PELLEGRINO, R.; De MURTAS, V.; PINNA, F.; TOMAIS, M. L.; FRAU, M.; VIRDIS, P.; De MIGLIO, M. R.; MURONI, M. R.; PASCALE, R. M.; FEO, F. Altered methionine metabolism and global DNA methylation in liver cancer: relationship with genomic instability and prognosis. *Int. J. Cancer*. 2007; 121:2410-2420.

CANISTRO, D.; POZZETTI, L.; SAPONE, A.; BROCCOLI, M.; BONAMASSA, B.; LONGO, V.; LUBRANO, V.; BARILLARI, J.; BIAGI, G. L.; PAOLINO, M. Perturbation of rat hepatic metabolizing enzymes by folic acid supplementation. *Mutat. Res.* 2008; 637: 16-22.

CERDA, H.; DELINCEE, H.; HAINE, H.; RUPP, H. The DNA “comet assay” as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat. Res.* 1997; 375: 167-181.

CHAGAS, C. E. A.; VIEIRA, A.; ONG, T. P.; MORENO, F. S. Farnesol inhibits cell proliferation and induces apoptosis after partial hepatectomy in rats. *Acta Cir. Bras*. 2009; 24: 377-82.

CHEN, H.; LI, S.; LIU, J.; DIWAN, B. A.; BARRET, J. C.; WAALKES, M. P. Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2004; 25: 1779-86.

COPELAND, D. H.; SALMON, W. D. the occurrence of neoplasm in the liver, lungs, and other tissues of the rat as a result of prolonged choline deficiency. *Am. J. Pathol.* 1946; 22:1059-1079.

CRAVO, M. L.; MASON, J. B.; DAYAL, Y.; HUTCHINSON, M.; SMITH, D.; SELHUB, J.; ROSENBERG, I. H. Folate deficiency enhances the development of colonic neoplasia in dimethylhydrazine-treated rats. *Cancer Res.* 1992; 52: 5002-5006.

DHINGRA, S.; BANSAL, M.P. Modulation of hypercholesterolemia-induced alterations in apolipoprotein B and HMG-CoA reductase expression by selenium supplementation. *Chem. Biol. Interact.,*2006; 161: 49-56.

DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. Lessons learned from the development of abl tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest.* 2000; 105: 3-7.

DU, Y-P.; PENG, J-S.; SUN, A.; TANG, Z-H.; LING, W-H.; ZHU, H-I. Assessment of the effect of betaine on *p16* and *c-myc* DNA methylation and mRNA expression in a chemical induced rat liver cancer model. *BMC Cancer,* 2009; 9: 261-270.

DUNN, B. K. Hypomethylation: One side of a larger picture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 983:28-42.

DUTHIE, S. J.; HAWDON, A. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. *FASEB J.* 1998; 12:1491-1497.

EILERS, M.; EISENMAN, R. N. Myc's broad reach. *Genes Dev.* 2008; 22: 2755-2766.

ENOMOTO, K.; FARBER, E. Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res.* 1982; 42: 2330-2335.

ESTELLER, M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol.* 2003; 4: 351-358.

ESPÍNDOLA, R. M.; MAZZANTINI, R. P.; ONG, T. P.; De CONTI, A.; HEIDOR, R.; MORENO, F. S. Geranylgeraniol and beta-ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kappaB activation. *Carcinogenesis.* 2005; 26: 1091-1099.

FARBER, E.; SARMA, D. S. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. *Lab. Invest.* 1987; 56:4-22.

FARBER, E. Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. *Cancer* 1988; 62: 1676-9.

FARBER, E.; RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res.* 1991; 51: 2751-61.

FEI, S.J.; XIAO, S.D.; PENG, Y.S.; CHEN, X.Y.; SHI, Y. Chemopreventive effects of rofecoxib and folic acid on gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Chin. J. Dig. Dis.* 2006; 7: 134-140

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature*. 2006; 7: 20-33.

FEINBERG, A. P. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *J. Am. Med. Assoc.* 2008; 299:1345-1350.

FEO, F.; GARCEA, R.; DAINO, L.; PASCALE, R.; PIRISI, L.; FRASSETTO, S.; RUGGIU, M. E. Early stimulation of polyamine biosynthesis during promotion by phenobarbital of diethylnitrosamine-induced rat liver carcinogenesis. The effect of variations of S-adenosyl-L-methionine cellular pool. *Carcinogenesis.* 1985; 6: 1713-20.

FEND, F.; RAFFELD, M. Laser capture microdissection in pathology. *J. Clin. Pathol*. 2000; 53:666-672.

FONSECA, E. M. A. V.; CHAGAS, C. E. A.; MAZZANTINI, R. P.; HEIDOR, R.; ONG, T. P.; MORENO, F. S. 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.* 2005; 26: 1940-6.

FRAGA, M. F.; ESTELLER, M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *TRENDS Genet*. 2007; 23:413-418.

FRANKS, L. M.; KNOWLES, M. A. What is cancer? In.: KNOWLES, M.; SELBY, P. *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer.* Oxford, 4 ed., p. 1-23, 2005.

FU, Y.; DENG, W.; KAWARADA, Y.; KAWAGOE, M.; MA, Y.-Z.; LI, X.; GUO, N.; KAMEDA, T.; TERADA, K.; SUGIYAMA, T. Mutation and expression of the p53 gene during chemical hepatocarcinogenesis in F344 rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003; 1628: 40-49.

GARCEA, R.; DAINO, L.; PASCALE, R.; SIMILE, M. M.; PUDDU, M.; RUGGIU, M. E.; SADDAIU, M. A.; SATTA, G.; SEQUENZA, M. J.; FEO, F. Protooncogene methylation and expression in regenerating liver and preneoplastic liver nodules induced in the rat by diethylnitrosamine: effects of variations of S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio. *Carcinogenesis.* 1989; 10; 1183-1192.

GHOSHAL, A. K.; FARBER, E. The induction of liver cancer by a dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Cancer Res.* 1984; 5: 16367-16370.

GRASL-KRAUPP, B.; BURSCH, W.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; WAGNER, A.; LAUER, B.; SHULTE-HERRMANN, R. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 9995-9999.

GRONBAEK, K.; HOTHER, C.; JONES, P. A. Epigenetics changes in cancer. *APMIS*. 2007; 115:1039-1059.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer . *Cell.* 2000; 100: 57-70.

HIGGINS, G. M.; ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial hepatectomy. *Anal. Biochem.* 1931; 12: 186-202.

HONG, W. K.; SPORN, M. B. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science.* 1997; 278: 1073-1077.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981; 29: 577-80.

IARC. *World Cancer report.* STEWART, B. W.; KLEIHUES, P. eds. IARC Press/Oxford University Press, 2003.

IMAI, T.; MASUI, T.; ICHINOSE, M.; NAKANISHI, H.; YANAI, T.; MASEGI, T.; MURAMATSU, M. Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by in situ hybridization. *Carcinogenesis.* 1997; 18: 545-51.

INCA. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, 2010, 100p.

JAMES, S.J.; POGRIBNY, I.P.; POGRIBNA, M.; MILLER, B.J.; JERNIGAN, S.; MELNYK, S. Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-diet rat model of hepatocarcinogenesis. *J. Nutr.,* 2003; 133; 3740S-3747S.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; SMIGAL, C.; THUN, M. J. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2006; 56: 106-30.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; THUN, M.J. Cancer incidence, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009; 59: 225-249.

JONES, P.A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetics events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 2002; 3: 415-428.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The epigenome of cancer. *Cell.* 2007; 128: 683-692.

KAPOSI-NOVAK, P.; LIBBRECHT, L.; WOO, H. G.; LEE, Y-H.; SEARS, N. C.; CONNER, E. A.; FACTOR, V. M.; ROSKAMS, T.; THORGEIRSSON, S. S. Central role of *c-Myc* during malignant conversion in human hepatocarciongenesis. *Cancer Res.* 2009; 7:2775-2782.

KENSLER, T. W.; QUIAN, G. S.; CHEN, J. G.; GROOPMAN, J. D. Translation strategies for cancer prevention in liver. *Nat. Rev. Cancer*. 2003; 3: 321-329.

KIM, Y. I. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J. Nutr. Biochem*. 1999; 10: 66-88.

KIM, Y. I. Role of folate in colon cancer development and progression. *J. Nutr.* 2003; 133: 3731S-3739.

KIM, Y. I. Folate, colorectal carcinogenesis, and DNA methylation: lessons from animal studies. *Environ. Mol. Mutagen.* 2004; 44: 10-25.

KIM, Y. I.; SALOMON, R. N.; GRAEME-COOK, F.; CHOI S. W.; SMITH, D. E.; DALLAL, G. E.; MASON, J. B. Dietary folate protects against the development of macroscopic colonic neoplasia in a dose responsive manner in rats. *Gut.* 1996; 39: 732-740.

KIM, Y. I. Folate and colorectal cancer: An evidence-based critical review. *Mol. Nutr. Food Res*. 2007a; 51:267-292.

KIM, Y. I. Folic acid fortification and supplementation – Good for some but not so good for others. *Nutr. Rev.* 2007b; 504-511.

KIM, J.-O.; KIM, H.-N.; HWANG, M.-H.; SHIN, H.-I.; KIM, S.-Y.; PARK, R.-W.; PARK, E.-Y.; KIM, I.-S.; van WIJNEN, A. J.; STEIN, J. L.; LIAN, J. B.; STEIN, G. S.; CHOI, J.-Y. Differential gene expression analysis using paraffin-embedded tissues after laser microdissection. *J. Cell. Biochem.* 2003; 90: 998-1006.

KIM, M. J.; WHITE-CROSS, J. A.; SHEN, L.; ISSA, J. P.; RASHID, A. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 in hepatocellular carcinomas. *Mod. Pathol.* 2009; 22:442-449.

KOTSOPOULOS, J.; MEDLINE, A.; RENLUND, R.; SOHN, K. J.; MARTIN, R.; HWANG, S. W.; LU, S.; ARCHER, M. C.; KIM, Y. I. Effects of dietary folate on the development and progression of mammary tumors in rats. *Carcinogenesis.* 2005; 26: 1603-12.

KUO, C. S.; LIN, C. Y.; WU, M. Y.; LU, C. L.; HUANG, R. F. Relationship between folate status and tumor progression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br. J. Nutr.* 2008; 14: 1-7.

KUROIWA-TRZMIELINA, J.; De CONTI, A.; SCOLASTICI, C.; PEREIRA, D.; HORST, M. A.; PURGATTO, E.; ONG, T. P.; MORENO, F. S. Chemoprevention of rats hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug. *Int. J. Cancer*. 2009; 124:2520-2527.

LACONI, E.; TOMASI, C.; CURRELI, F.; LACONI, S.; SERRA, G.; COLLU, M.; PANI, P. Early exposure to restraint enhances chemical carcinogenesis in rat liver. *Cancer Lett.* 2000; 161: 215-20.

LAMPRECHT, S. A.; LIPKIN, M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3: 601-14.

LELEU, R. K.; YOUNG, G. P.; McINTOSH, G. H. Folate deficiency diminishes the occurrence of aberrant crypt foci in the rat colon but does not alter global methylation status. *J. Gastroenterol. Hepatol***.** 2000; 15: 1158-1164.

LIN, C.H., HSIEH, S.H., SHEEN, I.S., LEE, W.C., CHEN, T.C., SHYU, W.C., LIAW, Y.F. Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res*. 2001; 61: 4238, 2001.

LOEB, L. A.; LOEB, K. R.; ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 4: 776-81.

LOMBARDI, B.; CHANDAR, N.; LOCKER, J. Nutritional model of carcinogenesis: rats fed a choline devoid diet. *Dig. Dis. Sci.* 1991; 36: 979-984.

MAGGIONI, M.; COGGI, G.; CASSANI, B.; BIANCHI, P.; ROMAGNOLI, S.; MANDELLI, A.; BORZIO, M.; COLOMBO, P.; RONCALLI, M. Molecular changes in hepatocellular dysplastic nodules on microdissected liver biopsies. *Hepatology.* 2000; 32: 942-946.

MAZZANTINI, R. P.; De CONTI, A.; MORENO, F. S. Persistent and remodeling hepatic preneoplastic lesions present differences in cell proliferation and apoptosis, as well as in p53 Bcl-2 and NF-kappaB pathways. *J. Cell. Biochem.* 2008; 103:538-546.

MEYER, N.; PENN, L. Z. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat. Rev. Cancer*. 2008; 8: 976-990.

MIKOL, Y. B.; HOOVER, K. L.; CREASIA, D.; POIRIER, L. A. Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis.* 1983; 4: 1619-29.

MORENO, F. S.; RIZZI, M. B.; DAGLI, M. L.; PENTEADO, M. D. V. Inhibitory effects of beta-carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis.* 1991; 12: 1817-1822.

MORENO, F. S.; WU, T. S.; PENTEADO, M. D. V.; RIZZI, M. B.; JORDÃO-JÚNIOR, A. A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; DAGLI, M. L. A comparison of beta-carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. *Int. J. Vitamin. Nutr. Res.* 1995; 65: 87-94.

MORENO, F. S.; S-WU, T.; NAVES, M. M.; SILVEIRA, E. R.; OLORIS, S. C.; da COSTA, M. A.; DAGLI, M. L.; ONG, T. P. Inhibitory effects of beta-carotene and vitamin A during the progression phase of hepatocarcinogenesis involve inhibition of cell proliferation but not alterations in DNA methylation. *Nutr. Cancer*. 2002; 44: 80-88.

NAGY, P.; EVARTS, R. P.; MARSDEN, E.; ROACH, J.; THORGEIRSSON, S. S. Cellular distribution of c-myc transcripts during chemical hepatocarcionogenesis in rats. *Cancer Res*. 1988; 48:5522-5527.

NAKAGAWA, T.; KANAI, Y.; USHIJIMA, S.; KITAMURA, T.; KAKIZOE, T.; HIROHASHI, S. DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. *J. Urol*. 2005; 173: 243, 2005.

NIU, Z. S.; LI, B. K.; WANG, M. Expression of *p53* and *c-myc* genes and its clinical relevance in the hepatocellular carcinomatous and pericarcinomatous tissues. *World J. Gastroenterol.* 2002; 8: 822-826.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P.; DURAND, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the ´comet´ assay. *Radiation Res.* 1990; 122: 8-94.

OLIVEIRA, V.; MAZZANTINI, R. P.; ONG, T. P.; JORDÃO Jr, A. A.; VANNUCCHI, H.; DAGLI, M. L. Z.; MORENO, F. S. Absence of inhibitory effects of phenylacetate on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis. *Int. J. Med. Biol. Envirol.* 2001; 29: 179-184.

ONG, T. P.; HEIDOR, R.; de CONTI, A.; DAGLI, M. L.; MORENO, F. S. 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.* 2006; 27: 1194-1203.

PASCALE, R. M.; SIMILE, M. M.; DeMIGLIO, M. R.; NUFRIS, A.; DAINO, L.; SADDAIU, M. A.; RAO, P. M.; RAJALAKSMI, S.; SARMA, D. S.; FEO, F. Chemoprevention by S-adenosyl-L-methionine of rat liver carcinogenesis initiated by 1,2-dimethylhydrazine and promoted by orotic acid. *Carcinogenesis.* 1995; 16: 427-430.

PASCALE, R. M.; SIMILE, M. M.; DeMIGLIO, M. R.; FEO, F. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis: S-adenosyl-L-methionine. *Alcohol.* 2002; 27: 1993-1998.

PEREIRA, M.A.; WANG, W.; KRAMER, P.M.; TAO, L. Prevention by methionine of dichloroacetic acid-induced liver cancer and DNA hypomethylation in mice. *Toxicol. Sci.* 2004; 77: 243-8.

PITOT, H. C. Animal models of neoplastic development. *Dev. Biol.* (Basel). 2001; 106:53-7.

POIRIER, L. A. The effects of diet, genetics and chemical on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. *J. Nutr.* 2002; 132: 2336S-2339S.

POGRIBNY, I. P.; BELAND, F. A. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66:2249-2261.

PONZIELLI, R.; KATZ, S.; BARSYTE-LOVEJOY, D.; PENN, L. Z. Cancer therapeutics: targeting the dark side of Myc. *Eur. J. Cancer.* 2005; 41: 2485-2501.

RIZZI, M. B.; DAGLI, M. L.; JORDÃO Jr, A. A.; PENTEADO, M. D. V.; MORENO, F. S. Beta-carotene inhibits persistent and stimulates remodeling gamma GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1997; 67: 415-22.

ROBERTSON, K. D.; JONES, P. A. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis.* 2000; 21:461-467.

ROSS, S. A. Diet and DNA methylation interactions in cancer prevention. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 983: 197-207.

SAMPAIO, A. D; CHAGAS, C. E. A.; ONG, T. P.; MORENO, F. S. Vitamin E and beta-carotene inhibitory effect during 1,2-dimethylhydrazine induced hepatocarcinogenesis potentiated by 5-azacytidine. *Food Chem. Toxicol.* 2007; 45:563-567.

SANDERSON, P.; STONE, E.; KIM, Y-I.; MATHERS, J.C.; KAMPMAN, E.; DOWNES, C.S.; MUIR, K.R.; BARON, J.A. Folate and colon-rectal cancer risk. *Br. J. Nutr.* 2007; 98:1299-1304.

SELL, S.; HUNT, J. M.; KNOLL, B. J.; DUNSFORD, H. A. Cellular events during hepatocarcinogenesis in rats and the question of premalignancy. *Adv. Cancer Res.* 1987; 48: 37-111.

SEMPLE-ROBERTS, E.; HAYES, M. A.; AMSTRONG D.; BECKER, R. A.; RACZ, W. J.; FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. *Int. J. Cancer.* 1987; 40: 643-5.

SHACHAF, C.M.; KOPELMAN, A.M.; ARVANITIS, C.; KARLSSON, A.; BEER, S.; MANDL, S.; BACHMANN, M.H.; BOROWSKY, A.D.; RUEBNER, B.; CARDIFF, R.D.; YANG, Q.; BISHOP, J.M.; CONTAG, C.H.; FESHER, D.W. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumor dormancy in hepatocellular cancer. *Nature*, 2004; 431: 1112–1117.

SHANE, B. Folate fortification: enough already? *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 77: 8-9.

SIMILE, M. M.; PASCALE, R.; De MIGLIO, M. R.; NUFRIS, A.; DAINO, L.; SADDAIU, M. A.; GASPA, L.; FEO, F. Correlation between S-adenosyl-L-methyonine content and production of c-myc, *c-Ha-ras*, and c-Ki-ras mRNA transcripts in the early stages of rat liver carcinogenesis. *Cancer Lett.* 1994; 29: 9-16.

SIMILE, M. M.; SAVIOZZI, M.; DeMIGLIO, M. R.; MURONI, M. R.; NUFRIS, A.; PASCALE, R. M.; MALVALDI, G.; FEO, F. Persistent chemopreventive effect of S-adenosyl-L-methionine on the development of liver putative preneoplastic lesions induced by thibenzamide in diethylnitrosamine-initiated rats. *Carcinogenesis.* 1996; 17: 1533-7.

SIMILE, M.M., PAGNAN, G., PASTORINO, F., BRIGNOLE, C., De MIGLIO, M.R., MURONI, M.R., ASARA, G., FRAU, M., SADDAIU, M.A., CALVISI, D.F., FEO, F., PONZONI, M., PASCALE, R.M., Chemopreventive N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (fenretinide) targets deregulated NF-{kappa}B and Mat1A genes in the early stages of rat liver carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26: 417-27.

SMITH, A. D.; KIM, Y. I.; REFSUM, H. Is folic acid good for everyone? *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87:517-533.

SOLT, D.; FARBER, E. New principles for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature.* 1976; 263: 701-703.

SONG, J.; MEDLINE, A.; MASON, J. B.; GALLINGER, S.; KIM, Y. I. Effects of dietary folate on intestinal tumorigenesis in the apcMin mouse. *Cancer Res.* 2000a; 60: 5494-40.

SONG, J.; SOHN, K. J.; MEDLINE, A.; ASH, C.; GALLINGER, S.; KIM, Y. I. Chemopreventive effects of dietary folate on intestinal polyps in Apc+/-Msh2-/- mice. *Cancer Res.* 2000b; 60: 3191-3199.

SPORN, M. B.; DUNLOP, N. M.; NEWTON, D. L.; SMITH, J. M. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed. Proc.* 1976; 35: 1332-1338.

SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention: and essential approach to controlling cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2: 537-543.

STINCHCOMBE, S.; BUCHMANN, A.; BOCK, K. W.; SCHWARZ, M. Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis.* 1995; 16: 1271-1275.

SU, Q.; BANNASCH, P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2003; 31:126-33.

TAO, T.; WANG, W.; KRAMER, P. M.; LUBET, R. A.; STEELE, V. E.; PEREIRA, M. A. Modulations of DNA hypomethylation as a surrogate endpoint biomarker for chemoprevcention of colon cancer. *Mol. Carcinogenesis*. 2004; 39:79-84.

TATEMATSU, M.; NAGAMINE, Y.; FARBER, E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res.* 1983; 43:5049-58.

THUN, M.J.; DeLANCEY, J.O.; CENTER, M.M.; JEMAL, A.; WARD, E.M. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis.* 2010*;* 31: 100-110.

TRYNDYAK, V. P.; MUSKHELISHVILI, L.; KOVALCHUK, O.; RODRIGUEZ-JUAREZ, R.; MONTGONERY, B.; CHURCHWELL, M. I.; ROSS, S. A.; BELAND, F. A.; POGRIBNY, I. P. Effect of long-term tamoxifen exposure on genotoxic and epigenetic changes in rat liver: implications for tamoxifen-induced hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2006; 27:1713-1720.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 2004*;* 10:789-799.

WATTS, G. S.; FUTSCHER, B. W.; HOLTAN, N.; DeGEEST, K.; DOMANN, F. E.; ROSE, S. L. DNA methylation changes in ovarian cancer are cumulative with disease progression and identify tumor stage. *BMC Med. Genomics*. 2008; 1:47.

WELZEL, T. M.; KATKI, H. A.; SAKODA, L. C.; EVANS, A. A.; LONDON, W. T.; CHEN, G.; O'BROIN, S.; SHEN, F. S.; LIN, W. Y.; McGLYBB, K. A. Blood folate levels and risk of liver damage and hepatocellular carcinoma in a prospective high-risk cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007; 16:1279-82.

WHO. *Cancer*. Fact sheet n° 297. Feb 2006. Geneva: World Health Organization; 2007. Acesso em: 17 de agosto de 2009: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html.

WIDSCHWENDTER, M.; JIANG, G.; WOODS, C.; MULLER, H. M.; FIEGL, H.; GOEBEL, G.; MARTH, C.; MULLER-HOLZNER, E.; ZEIMET, A. G.; LAIRD, P. W.; EHRLICH, M. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res.* 2004; 64:4472, 2004.

WILKINSON, E. World cancer report. *Lancet Oncol*. 2003; 4: 321.

WOOD, G.A.; KORKOLA, J.E.; ARCHER, M.C. Tissue-specific resistance to cancer development in the rat: phenotypes of tumor-modifier genes. *Carcinogenesis,* 2002; 23:1-9.

WORM, J.; GULDBERG, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J. Oral Pathol. Med.* 2002; 31: 443-9.

XIAO, S. D.; MENG, X. J.; SHI, Y.; HU, Y. B.; ZHU, S. S; WANG, C. W. Interventional study of high dose folic acid in gastric carcinogenesis in beagles. *Gut.* 2002; 50: 61-64.

YOUNG, M. R.; YANG, H-S.; COLBURN, N. H. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kB and Pdcd4. *Trends in Molec. Med*., 2003; 9:36-41, 2003.

APÊNDICES

TABELA 1	Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de cólon publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.	p. 60
TABELA 2	Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de mama publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.	p. 62
TABELA 3	Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.	p. 64
TABELA 4	Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de pâncreas publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.	p. 65
TABELA 5	Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de próstata publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.	p. 66
TABELA 6	Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de fígado publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.	p. 67
TABELA 7	Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de estômago publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.	p. 68
TABELA 8	Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de ovário publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.	p. 69

TABELA 1: Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de cólon publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.

Referência	Desenho experimental	Resultado
Roswall *et al*., 2010	Coorte com 56.332 indivíduos dinamarqueses com idade entre 50-64 anos monitorados durante 4 anos.	↑
Kim *et al.*, 2009	Caso-controle	↑
Figueredo *et al.*, 2008	Homens e mulheres participantes do *Aspirin/Folate polyp prevention Study.*	↑
Kabat *et al.*, 2008	Coorte com 89.835 mulheres canadenses monitoradas por 16,4 anos.	↓
Vogel *et al*., 2008	Coorte com 120.852 homens e mulheres holandesas monitoradas durante 13,3 anos.	↓
Murtaugh *et al.,* 2007	Caso-controle (715 casos e 979 controles).	↑
Otani *et al.,* 2005	Caso-controle (107 casos e 224 controles).	↑
Van den Donk *et al.,* 2005	Caso-controle (768 casos e 709 controles).	↓
Larsson *et al.,* 2005	Coorte com 61.433 mulheres suecas entre 40-75 anos monitoradas durante 17 anos	↑
Sanjoaquin *et al.*, 2005	Meta-análise.	↑
Zhang *et al.,* 2005	Coorte com 37.916 mulheres norte-americanas monitoradas durante 10,1 anos.	↑

↑ Associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

↓ Sem associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

REFERÊNCIAS

FIGUEIREDO, J.C.; LEVINE, A.J.; GRAU, M.V.; BARRY, E.L.; UELAND, P.M.; AHNEN, D.J.; BYERS, T.; BRESALIER, R.S.; SUMMERS, R.W.; BOND, J.; McKEOWN-EYSSEN, G.E.; SANDLER, R.S.; HAILE, R.W.; BARON, J.A. Colorectal adenomas in a randomized folate trial: the role of baseline dietary and circulation folate levels. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008; 17: 2625-31.

KABAT, G.C.; MILLER, A.B.; JAIN, M.; ROHAN, T.E. Dietary intake of selected B vitamins in relation to risk of major cancers in women. *Br. J. Cancer.* 2008; 99: 816-821.

KIM, J.; KIM, D.H.; LEE, B.H.; KANG, S.H.; LEE, H.J.; SUH, Y.K.; AHN, Y.O. Folate intake and the risk of colorectal cancer in a Korean population. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2009b; 63: 1057-64.

MURTAUGH, M.A.; CURTIN, K.; SWEENEY, C.; WOLFF, R.K.; HOLUBKOV, R.; CAAN, B.J.; SLATTERY, M.L. Dietary intake of folate and co-factors in folate metabolism *MTHFR* polymorphisms, and reduced rectal cancer. *Cancer Causes Control.* 2007; 18: 153-163.

LARSSON, S.C.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. A prospective study of dietary folate intake and risk of colorectal cancer: modification by caffeine intake and cigarette smoking. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14: 740-3.

OTANI, T.; IWASAKI, M.; HANAOKA, T.; KOBAYASHI, M.; ISHIHARA, J.; NATSUKAWA, S.; SHAURA, K.; KOIZUMI, Y.; KASUGA, Y.; YOSHIMURA, K.; YOSHIDA, T.; TSUGANE, S. Folate, vitamin B6, vitamin B12, and vitaminB2 intake, genetic polymorphisms of related enzymes, and risk of colorectal cancer in a hospital-based case-control study in Japan. *Nutr Cancer,* 2005; 53: 42-50.

ROSWAL, N.; OLSEN, A.; CHRISTENSEN, J.; DRAGSTED, L.O.; OVERVAD, K.; TJONNELAND, A. Micronutrient intake and risk of colon and rectal cancer in a Danish cohort. *Am. J. Epidemiol.* 2010. Aceito para publicação.

SANJOAQUIM, M.A.; ALLEN, N.; COUTO, E.; RODDAM, A.W., KEY, T.J. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Int. J. Cancer.* 2005; 113; 825-8.

VAN DEN DONK, M.; BUJISSE, B.; VAN DEN BERG, S.W.; OCKÉ, M.C.; HARRYVAN, J.L.; NAGENGAST, F.M.; KOK, F.J.; KAMPMAN, E. Dietary intake of folate and riboflavin, MTHFR C677T genotype, and colorectal adenoma risk: a Dutch case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14: 1562-6.

VOGEL, S.; DINDORE, V.; VAN ENGELAND, M.; GOLDBOHM, A.; VAN DEN BRAND, P.A.; WEIJENBERG, M.P. Dietary folate, methionine, riboflavin, and vitamin B-6 and risk of sporadic colorectal cancer. *J. Nutr.* 2008; 138: 2372-78.

ZHANG, S.M.; MOORE, S.C.; LIN, J.; COOK, N.R.; MANSON, J.E.; LEE, I.M.; BURING, J.E. Folate, vitamin B6, multivitamins supplements, and colorectal cancer risk in women. *Am. J. Epidemiol.* 2006; 163: 108-115.

TABELA 2: Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de mama publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.

Referência	Desenho experimental	Resultado
Ma *et al.,* 2009a	Caso-controle (388 casos e 388 controles).	↓
Ma *et al.*, 2009b	Caso-controle (458 casos e 458 controles).	↓
Kabat *et al.,* 2008	Coorte com 89.835 mulheres canadenses monitoradas por 16,4 anos	↓
Ericson *et al.*, 2007	Coorte com 11.699 mulheres suecas pós-menopausa monitoradas durante 9,5 anos.	↑
Larsson *et al.,* 2007	Meta-análise	↓
Lajous *et al.,*2006a	Caso-controle (475 casos e 1.391 controles).	↑
Lajous *et al.*, 2006b	Coorte com 62.739 mulheres francesas monitoradas durante 9 anos.	↑
Tjonneland *et al.,* 2006(*)	Coorte com 24.697 mulheres pós-menopausa monitoradas durante um período de 3 a 7 anos.	↑
Stolzenberg-Solomon *et al.,* 2006	Coorte com 25.400 mulheres norte-americanas monitoradas durante 10 anos.	↓
Baglietto *et al.,* 2005(*)	Coorte com 17.447 australianas com idade entre 40-69 anos monitoradas durante período de 9 a 13 anos.	↓
Chen *et al.,* 2005	Caso-controle (1.481 casos e 1.518 controles).	↑
Otani *et al.*, 2005	Coorte com 61.433 mulheres suecas entre 40-75 anos	↓
Van den Donk *et al.,* 2005	Coorte com 90663 mulheres pré-menopausa com idade entre 26 e 46 anos monitoradas durante 12 anos	↓
Larsson *et al.*, 2005	Estudo transversal com 475 mulheres diagnosticadas com câncer de mama	↑

↑ Associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

↓ Sem associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

* Associação positiva entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer em mulheres que consomem etanol diariamente.

REFERÊNCIAS

BAGLIETTO, L.; ENGLISH, D.R.; GERTIG, D.M.; HOPPER, J.L.; GILES, G.G. Does dietary folate intake modify effect of alcohol consumption on breast cancer risk? Prospective cohort study. *BMJ,* doi:10.1136/bmj.38551.446470.06 (published 8 August 2005).

CHEN, J.; GAMMON, M.D.; CHAN, W.; POLOMEQUE, C.; WETMUR, J.G.; KABAT, G.C.; TEITELBAUM, S.L.; BRITTON, J.A.; TERRY, M.B.; NEUGUT, A.I.; SANTELLA, R.M. One-carbon metabolism, *MTHFR* polymorphisms, and risk of breast cancer. *Carcer Res.* 2005; 65: 1606-14.

ERICSON, U.; SONESTEDT, E.; GULLBERG, B.; OLSSON, H.; WIRFALT, E. High folate intake is associated with lower breast cancer incidence in postmenopausal women in the Malmo Diet and Cancer Cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007; 86: 434-43.

KABAT, G.C.; MILLER, A.B.; JAIN, M.; ROHAN, T.E. Dietary intake of selected B vitamins in relation to risk of major cancers in women. *Br. J. Cancer.* 2008; 99: 816-821.

LAJOUS, M.; LAZCANO-PONCE, E.; HERNANDEZ-AVILA, M.; WILLET, W.; ROMIEU, I. Folate, vitamin B(6) and vitamin B(12) intake and the risk of breast cancer among Mexican women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006a: 443-8.

LAJOUS, M.; ROMIEU, I.; SABIA, S.; BOUTRON-RUAULT, M-C.; CHAVEL-CHAPELON, F. Folate, vitamin B12 and postmenopausal breast cancer in a prospective study of French women. *Cancer Causes Control.* 2006; 17: 1209-1213.

LARSSON, S.C.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. A prospective study of dietary folate intake and risk of colorectal cancer: modification by caffeine intake and cigarette smoking. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14: 740-3.

LARSSON, S.C.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. Folate and risk of breast cancer: a meta-analysis. *J. Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 64-76.

MA, E.; IWASAKI, M.; KOBAYASHI, M.; KASUGA, Y.; YOKOYAMA, S.; ONUMA, H.; NISHIMURA, H.; KUSAMA, R.; TSUGANE, S. Dietary intake of folate, vitamin B2, vitamin B6, vitamin B12 and genetic polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Japan. *Nutr. Cancer.* 2009a; 61: 447-56.

MA, E.; IWASAKI, M.; JUNKO,, I.; HAMADA, G.S.; NISHIMOTO, I.N.; CARVALHO, S.M.T.; MOTOLA Jr, J.; LIGINHA, F.M.; TSUGANE, S. Dietary intake of folate, vitamins B6, and vitamin B12, genetic polymorphism op related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Brazilian women. *BMC Cancer.* 2009; 9: 122-132.

OTANI, T.; IWASAKI, M.; HANAOKA, T.; KOBAYASHI, M.; ISHIHARA, J.; NATSUKAWA, S.; SHAURA, K.; KOIZUMI, Y.; KASUGA, Y.; YOSHIMURA, K.; YOSHIDA, T.; TSUGANE, S. Folate, vitamin B6, vitamin B12, and vitaminB2 intake, genetic polymorphisms of related enzymes, and risk of colorectal cancer in a hospital-based case-control study in Japan. *Nutr Cancer,* 2005; 53: 42-50.

STOLZENBERG-SOLOMON, R.Z.; CHANG, S-C.; LEITZMAN, M.F.; JONHSON, K.A.; JONHSON, C.; BUYS, S.S.; HOOVER, R.N.; ZIEGLER, R.G. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 83: 895-904.

TJONNELAND, A.; CHRISTENSEN, J.; OLSEN, A.; STRIPP, C.; NISSEN, S.B.; OVERVAD, K.; THOMSEN, B.L. Folate intake, alcohol and risk of breast cancer among postmenopausal women in Denmark. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2006; 60: 280-286.

VAN DEN DONK, M.; BUJISSE, B.; VAN DEN BERG, S.W.; OCKÉ, M.C.; HARRYVAN, J.L.; NAGENGAST, F.M.; KOK, F.J.; KAMPMAN, E. Dietary intake of folate and riboflavin, MTHFR C677T genotype, and colorectal adenoma risk: a Dutch case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14: 1562-6.

TABELA 3: Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.

Referência	Desenho experimental	Resultado
Koutros *et al.,* 2008	Caso-controle (594 casos e 710 controles)	↑
Polesel *et al.,* 2007	Caso-controle (190 casos e 484 controles)	↓
Lim *et al.*, 2006	Coorte com 27.111 homens fumantes participantes do estudo ATBC monitorados durante 16,4 anos	↓

↑ Associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

↓ Sem associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

REFERÊNCIAS

KOUTROS, S.; ZHANG, Y.; ZHU, Y.; MAYNE, S.T.; ZAHM, S.H.; HOLFORD, T.R.; LEADERER, B.P.; BOYLE, P.; ZHENG, T. Nutrients contributing to one-carbon metabolism and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Am. J. Epidemiol.* 2008; 167: 287-294.

LIM, U.; WEINSTEIN, S.; ALBANES, D.; PIETINEN, P.; TEERENHOVI, L.; TAYLOR, P.R.; VIRTAMO, J.; STOLZENBERG-SOLOMON, R. Dietary factors of one-carbon metabolism in relation to non-Hodgkin lymphoma and multiple myeloma in a cohort of male smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006; 15: 1109-14.

POLESEL, J.; DAL MASO, L.; LA VECCHIA, C.; MONTELLA, M.; SPINA, M.; CRISPO, A.; TALAMINI, R.; FRANCESCHI, S. Dietary folate, alcohol consumption, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Nutr. Cancer.* 2007; 57: 146-50.

TABELA 4: Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de pâncreas publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.

Referência	Desenho experimental	Resultado
Oaks *et al.*, 2010	Coorte com 57.187 mulheres com idade entre 55-74 anos monitoradas durante 6,5 anos.	↑
Oaks *et al.*, 2010	Coorte com 51.988 homens com idade entre 55-74 anos monitoradas durante 6,5 anos.	↓
Gong *et al.*, 2009	Caso-controle (532 casos e 1701 controles).	↑
Keszei *et al.*, 2009	Coorte com 120.852 homens e mulheres holandesas monitorados durante 13,3 anos.	↓
Larsson *et al.,* 2006a	Meta-análise.	↑
Larsson *et al.,* 2006b	Coorte com 81.992 homens e mulheres monitorados durante 6,8 anos.	↑

↑ Associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

↓ Sem associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

REFERÊNCIAS

GONG, Z.; HOLLY, E.A.; BRACCI, P.M. Intake of folate, vitamins B6, B12 and methionine and risk of pancreatic cancer in a large population-based case-control study. *Cancer Causes Control.* 2009; 20: 1317-25.

KESZEI, A.P.; VERHAGE, B.A.; HEINEN, M.M.; GOLDBOHM, R.A.; VAN DEN BRANDT, P.A. Dietary folate and folate vitamers and the risk of pancreatic cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009; 18: 1785-91.

LARSSON, S.C.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. Folate intake, *MTHFR* polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology.* 2006a; 131: 1271-83.

LARSSON, S.C.; HAKANSSON, N.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. Folate intake and pancreatic cancer incidence: a prospective study of Swedish women and men. *J Natl. Cancer Inst.* 2006b; 98: 407-13.

OAKS, B.M.; DOSS, K.W.; MEINHOLD, C.L.; JIAO, L.; CHURCH, T.R.; STOLZENBERG-SOLOMON, R.Z. Folate intake, post-folic acid grain fortification, and pancreatic cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010; 91: 449-55.

TABELA 5: Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de próstata publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.

Referência	Desenho experimental	Resultado
Figueiredo *et al.*, 2009	Coorte com 651 homens com idade média de 41 anos monitorados por até 10,8 anos.	↑
Shannon *et al.*, 2009	Caso-controle (140 casos, 230 controles clínicos e 250 controles sem câncer de próstata).	↑
Kasperzyk *et al.*, 2009(†)	Retrospectivo com 525 suecos diagnosticados com câncer de próstata.	↓
Weinstein *et al.*, 2006	Coorte com 27.111 finlandeses com idade entre 50-69 anos monitorados durante 7 anos.	↓
Stevens *et al.*, 2006	Coorte com 65.836 homens monitorados durante 9 anos.	↓
Pelucchi *et al.*, 2005	Caso-controle (1.294 casos e 1.451 controles).	↑

↑ Associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

↓ Sem associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

† Sem associação positiva com a sobrevida de pacientes com câncer de próstata

REFERÊNCIAS

FIGUEIREDO, J.C.; GRAU, M.V.; HAILE, R.W.; SANDLER, R.S.; SUMMERS, R.W.; BRESALIER, R.S.; BURKE, C.A.; McKEOWN-EYSSEN, G.E.; BARON, J.A. Folic acid and risk of prostate cancer: results from a randomized clinical trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009; 101: 432-435.

KASPERZYK, J.L.; FALL, K.; MUCCI, L.A.; HAKANSSON, N.; WOLK, A.; JOHANSSON, J-E.; ANDERSSON, S-O.; ANDRÉN, O. One-carbon metabolism-related nutrients and prostate cancer survival. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; 90: 561-9.

PELUCCHI, C.; GALEONE, C.; TALAMINI, R.; NEGRI, E.; PARPINEL, M.; FRANCESCHI, S.; MONTELLA, M.; LA VECCHIA, C. Dietary folate and risk of prostate cancer in Italy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14: 944-8.

SHANNON, J.; PHOUTRIDES, E.; PALMA, A.; FARRIS, P.; PETERS, L.; FORESTER, A.; TILLOTSON, C.J.; GARZOTTO, M. Folate intake and prostate cancer risk: a case-control study. *Nutr. Cancer.* 2009; 61: 617-28.

STEVENS, V.L.; RODRIGUEZ, C.; PAVLUCK, A.L.; McCULLOUGH, M.L.; THUN, M.J.; CALLE, E.E. Folate nutrition and prostate cancer incidence. *Am. J. Epidemiol.* 2006; 163: 989-996.

WEINSTEIN, S.J.; STOLZENBERG-SOLOMON, R.; PIETINEN, P.; TAYLOR, P.R.; VIRTAMO, J.; ALBANES, D. Dietary factors of one-carbon metabolism and prostate cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84: 929-35.

TABELA 6: Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de fígado publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.

Referência	Desenho experimental	Resultado
Kuo *et al.*, 2007(#)	Estudo transversal com 60 pacientes com HCC	↑
Welzel *et al.*, 2007	Coorte com 450 indivíduos chineses com hepatite B monitorados durante 4 anos.	↑

↑ Associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

\# Associação inversa entre o consumo de folato e o prognóstico da doença

REFERÊNCIAS

KUO, C. S.; LIN, C. Y.; WU, M. Y.; LU, C. L.; HUANG, R. F. Relationship between folate status and tumor progression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br. J. Nutr.* 2008; 14: 1-7.

WELZEL, T. M.; KATKI, H. A.; SAKODA, L. C.; EVANS, A. A.; LONDON, W. T.; CHEN, G.; O'BROIN, S.; SHEN, F. S.; LIN, W. Y.; McGLYBB, K. A. Blood folate levels and risk of liver damage and hepatocellular carcinoma in a prospective high-risk cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2007; 16:1279-82.

TABELA 7: Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de estômago publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.

Referência	Desenho experimental	Resultado
Keszei *et al.*, 2009	Coorte com 61.433 mulheres suecas com idade entre 40-70 anos monitoradas durante 13,3 anos.	↓
Galván-Portillo *et al.*, 2009	Caso-controle (248 casos e 478 controles).	↑
Larsson *et al.*, 2006a.	Coorte com 61.433 mulheres suecas monitoradas durante um período de 7 a 17 anos.	↓
Larsson *et al.*, 2006b	Meta-análise.	↓

↑ Associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

↓ Sem associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

REFERÊNCIAS

GALVÁN-PORTILLO, M.V.; CANTORAL, A.; OÑATE-OCAÑA, L.F.; CHEN, J.; HERRERA-GOEPFERT, R.; TORRES-SANCHEZ, L.; HERNANDEZ-RAMIREZ, R.U.; PALMA-COCA, O.; LÓPSZ-CARRILLO, L. Gastric cancer in relation to the intake of nutrients involved in one-carbon metabolism among *MTHFR 677TT* carriers. *Eur. J. Nutr.* 2009; 48: 269-276.

KESZEI, A.P.; VERHAGE, B.A.; HEINEN, M.M.; GOLDBOHM, R.A.; VAN DEN BRANDT, P.A. Dietary folate and folate vitamers and the risk of pancreatic cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009; 18: 1785-91.

LARSSON, S.C.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. Folate intake and stomach cancer incidence in a prospective cohort of Swedish women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006a; 15: 1409-12.

LARSSON, S.C.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. Folate intake, *MTHFR* polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology.* 2006b; 131: 1271-83.

TABELA 8: Estudos que associam o consumo de folato com o risco de desenvolvimento de câncer de ovário publicados em periódicos indexados na base *Medline* no período de 2005 a 2010.

Referência	Desenho experimental	Resultado
Kotsopoulos *et al.*, 2010	Transversal com 152 mulheres com câncer de ovário.	↑
Navarro-Silveira *et al.,* 2009	Coorte com 49.613 mulheres canadenses monitoradas durante 16,4 anos.	↑
Kabat *et al.*, 2008	Coorte com 89.835 mulheres canadenses monitoradas por 16,4 anos	↓
Tworoger *et al.*, 2006	Coorte com 80.254 mulheres monitoradas durante 22 anos.	↑

↑ Associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

↓ Sem associação inversa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

↑ Associação inversa não estatisticamente significativa entre o consumo de folato e o risco de desenvolvimento de câncer.

REFERÊNCIAS

KABAT, G.C.; MILLER, A.B.; JAIN, M.; ROHAN, T.E. Dietary intake of selected B vitamins in relation to risk of major cancers in women. *Br. J. Cancer.* 2008; 99: 816-821.

KOTSOPOULOS, J.; HECHT, J.L.; MAROTTI, J.D.; KELEMEN, L.E.; TWOROGER, S.S. Relationship between dietary and supplementation intake of folate, methionine, vitamin B6 and folate receptor α expression in ovarian tumors. *Int. J. Cancer.* Aceito para publicação em 2010.

NAVARRO-SILVEIRA, S.A.; JAIN, M.; HOWE, G.R.; MILLER, A.B.; ROHAN, T.E. Dietary folate consumption and risk of ovarian cancer: a prospective cohort study. *Eur. J. Cancer Prev.* 2006; 15: 511-5.

TWOROGER, S.S.; HECHT, J.L.; GIOVANNUCCI, E.; HANKINSON, S.E. Intake of folate and related nutrients in relation to risk of epithelial ovarian cancer. *Am. J. Epidemiol.* 2006; 163: 1101-1111.

ANEXO

ANEXO 1 Aprovação do Comitê de Ética com Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. p. 71

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA nº 39/2006

São Paulo, 12 de junho de 2006.

Ilmo(a) Sr(a).
Carlos Eduardo Andrade Chagas
Orientador Prof. Fernando Salvador Moreno
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, em reunião realizada em 12 de junho do corrente, **APROVOU** o projeto "Avaliação das eventuais atividades quimiopreventivas do ácido fólico na hepatocarcinogênese em ratos" (Protocolo CEEA nº 111), apresentado por Vossa Senhoria.

Sendo o que nos cumpre, reiteramos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
Vice-Presidente da CEEA

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 30913677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br