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

**Expressão gênica diferencial de lesões pré-neoplásicas hepáticas de ratos Wistar
tratados com o quimiopreventivo β -ionona (β I): receptores nucleares como alvos
moleculares do composto bioativo de alimentos**

Mônica Testoni Cardozo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2011

Mônica Testoni Cardozo

Expressão gênica diferencial de lesões pré-neoplásicas hepáticas de ratos Wistar tratados com o quimiopreventivo β -ionona (β I): receptores nucleares como alvos moleculares do composto bioativo de alimentos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de 2011

RESUMO

Cardozo, M. T. **Expressão gênica diferencial de lesões pré-neoplásicas hepáticas de ratos Wistar tratados com o quimiopreventivo β -ionona (β I): receptores nucleares como alvos moleculares do composto bioativo de alimentos.** 2011. 97 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A β -ionona (BI) é um isoprenóide que apresenta atividade quimiopreventiva durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de genes modulados pela BI envolvidos na quimioprevenção durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese induzida pelo modelo do “Hepatócito Resistente” (RH). Ratos Wistar machos foram submetidos ao modelo do RH e tratados durante 4 semanas consecutivas com BI (16 mg/100 g de p.c.) ou óleo de milho (OM) (0,25 ml/100 g de p.c.; grupo controle). O perfil da expressão de 1.176 genes foi analisado por *macroarray* no fígado dos grupos BI, OM e de ratos considerados normais (grupo N). A expressão gênica foi considerada aumentada, quando a razão de expressão foi $\geq 1,5$ ou diminuída, quando $\leq 0,5$. Aplicou-se análise hierárquica de *clustering* e classificação ontológica dos genes diferencialmente expressos. A expressão gênica foi validada por RT-PCR do tipo “duplex”, utilizando-se tecido hepático microdissecado de: lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN) ou em remodelação (rLPN) e de regiões ao redor das LPN (*surrounding*). Um total de 133 e 32 genes foi considerado diferencialmente expresso entre os grupos OM (em relação ao N) e BI (em relação ao OM), respectivamente. Trinta e sete por cento dos genes diferencialmente expressos no grupo BI vs OM referiam-se a receptores celulares. Destes, 4 genes codificantes para receptores nucleares foram identificados como possíveis alvos da BI na quimioprevenção da hepatocarcinogênese: RXR α (receptor X de retinóide α), RAR β (receptor de ácido

retinóico β), COUP-TFI (*chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I*) e Nur77 (*nuclear receptor 77*). Em comparação ao grupo OM, a expressão de RXR α e RAR β foi maior ($p<0,05$) especificamente em pLPN e rLPN do grupo β I, respectivamente. Em comparação ao grupo N, Nur77 apresentou maior ($p<0,05$) expressão no *surrounding* e nas rLPN do grupo OM. Por outro lado, a expressão de Nur77 em rLPN foi menor ($p<0,05$) no grupo BI do que no OM. Comparada ao grupo N, a expressão de COUP-TFI foi maior ($p<0,05$) no grupo OM, tanto no *surrounding* das LPN como nas pLPN e rLPN. Em comparação ao grupo OM, a expressão de COUP-TFI foi menor ($p<0,05$) no grupo BI, especificamente nas pLPN e nas rLPN. Os resultados sugerem que os receptores nucleares RXR α , RAR β , Nur77 e COUP-TFI representam alvos moleculares da BI relevantes para a quimioprevenção da hepatocarcinogênese em ratos.

Palavras-chave: hepatocarcinogênese, quimioprevenção, β -ionona, alvos moleculares, receptores nucleares.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do isoprenóide cíclico β -ionona.....	19
Figura 2. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação das atividades quimiopreventivas da BI quando administrada durante 4 semanas consecutivas a ratos Wistar durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese...	25
Figura 3. Foto do equipamento de microdissecção.....	32
Figura 4. Fotomicrografias de lesão pré-neoplásica persistente hepática marcada histoquimicamente para γ -GT, coberta com etanol, a ser microdissecada (1) e das etapas da microdissecção (2, 3, 4).....	33
Figura 5. Membranas de <i>macroarray</i> após hibridização com sonda de cDNA hepático marcada com fósforo 32 e exposição em filme de raio-X.....	41
Figura 6. Clusters obtidos por análise hierárquica baseado na distância Euclidiana da expressão dos genes dos grupos N, OM e BI.....	43
Figura 7. Correlação de Pearson observada entre os diferentes grupos experimentais.....	45
Figura 8. Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos.....	46
Figura 9. RT-PCR duplex dos genes RXR α e β -actina. (A) Expressão dos genes RXR α e β -actina em tecido hepático normal, surrounding e lesões pré-neoplásicas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. (B) Quantificação da expressão hepática de RXR α , normalizada pela expressão do gene β -actina, no tecido hepático normal, surrounding e em lesões pré-neoplásicas hepáticas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI.....	51

Figura 10. RT-PCR duplex dos genes RAR β e GAPDH. (A) Expressão dos genes RAR β e GAPDH em tecido hepático normal, surrounding e lesões pré-neoplásicas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. (B) Quantificação da expressão hepática de RAR β , normalizada pela expressão do gene GAPDH, no tecido hepático normal, surrounding e em lesões pré-neoplásicas hepáticas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI..... 53

Figura 11. RT-PCR duplex dos genes Nur77 e β -actina. (A) Expressão dos genes Nur77 e β -actina em tecido hepático normal, surrounding e lesões pré-neoplásicas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. (B) Quantificação da expressão hepática de Nur77, normalizada pela expressão do gene β -actina, no tecido hepático normal, surrounding e em lesões pré-neoplásicas hepáticas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI..... 55

Figura 12. RT-PCR duplex dos genes COUP-TFI e β -actina. (A) Expressão dos genes COUP-TFI e β -actina em tecido hepático normal, surrounding e lesões pré-neoplásicas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. (B) Quantificação da expressão hepática de COUP-TFI, normalizada pela expressão do gene β -actina, no tecido hepático normal, surrounding e em lesões pré-neoplásicas hepáticas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI..... 57

Figura 13. Western blot das proteínas RAR β e β -actina. (A) Western blot das proteínas RAR β e β -actina realizado com proteína hepática do fígado de ratos dos grupos N, OM ou BI. (B) Quantificação da expressão hepática de RAR β , normalizada pela expressão de β -actina, no tecido hepático dos grupos N, OM ou BI..... 58

Figura 14. Alvos moleculares do quimiopreventivo β -ionona na etapa de promoção da hepatocarcinogênese..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores dos transcritos dos genes alvo, tamanho do produto e temperatura de anelamento, utilizados para análise de transcriptase reversa RT-PCR Duplex.....	37
Tabela 2. Classificação funcional dos 32 genes diferencialmente expressos no grupo BI em relação ao grupo OM.....	47
Tabela 3. Classificação funcional dos 133 genes diferencialmente expressos no grupo OM em relação ao grupo N.....	48
Tabela 4. Genes, razão da expressão gênica e classificação funcional dos genes diferencialmente expressos no grupo BI em relação ao grupo OM.....	49

LISTA DE ABREVIACÕES

2-AAF = 2-acetilaminofluoreno

BI = β -ionona

COUP-TFI = *Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I*

DEN = Dietilnitrosamina

GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GST-P = Glutathione S-transferase forma placentária

HBV = Vírus da hepatite B

HCC = Carcinoma Hepatocelular (do termo em inglês *Hepatocellular Carcinoma*)

HP = Hepatectomia Parcial

HVC = Vírus da hepatite C

LPN = Lesões pré-neoplásicas

N = Normal

OM = Óleo de Milho

OMS = Organização Mundial da Saúde

pLPN = Lesões pré-neoplásicas persistentes

RAR β = Receptor de ácido retinóico β

RH = Hepatócito Resistente (do termo em inglês *Resistant Hepatocyte*)

rLPN = Lesões pré-neoplásicas em remodelação

RXR α = Receptor X de retinóide α

S = *Surrounding*

γ -GT = γ -glutamyltranspeptidase

SUMÁRIO

RESUMO.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ABREVIACÕES.....	VII
SUMÁRIO.....	VIII
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
1.1 Aspectos epidemiológicos.....	10
1.2 Câncer e Hepatocarcinogênese.....	11
1.3 Modelo do Hepatócito Resistente.....	15
1.4 Quimioprevenção do câncer e β -ionona.....	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Macro-arranjo de DNA (<i>Macroarray</i>).....	25
3.1.1 Extração de RNA total.....	26
3.1.2 Síntese de cDNA marcado com isótopo radioativo.....	27
3.1.3 Hibridização e aquisição de imagens.....	28
3.2 Obtenção de cortes histológicos.....	30
3.3 Marcação histoquímica para γ -GT.....	30

3.4 Microdissecção de LPN persistentes, LPN em remodelação e <i>surrounding</i> das LPN do tecido hepático.....	31
3.5 Extração de RNA a partir do tecido hepático microdissecado.....	34
3.6 Análise da expressão gênica por meio da Reação em Cadeia de Polimerase - Transcriptase Reversa Duplex (RT-PCR Duplex).....	35
3.7 Análise da expressão de RAR β por meio de western blot.....	37
3.7.1 Preparação dos extratos protéicos.....	37
3.7.2 Western blot.....	38
3.8 Análise Estatística.....	39
4. RESULTADOS	40
4.1 Análise do perfil de expressão gênica.....	40
4.2 Validação da expressão gênica por RT-PCR duplex.....	49
4.3 Expressão de RAR β por western blot.....	58
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
 ANEXOS.....	 79

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aspectos epidemiológicos

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), o impacto global do câncer mais que dobrou nos últimos 30 anos (World Cancer Report, 2008). Em 2005, a incidência global foi de 11 milhões com mais de 7,6 milhões de mortes, sendo esperado um aumento nesta incidência para 15,5 milhões com 11,5 milhões de mortes até 2030 (Strong *et al.*, 2008). No Brasil, o câncer constitui a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida. As estimativas para o ano de 2011 apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer (INCA, 2010).

Dentre as neoplasias mais comuns, o carcinoma hepatocelular (HCC, do termo em inglês *hepatocellular carcinoma*) é considerado a 5º neoplasia mais frequente no mundo e a terceira principal causa de morte por câncer (Benowitz, 2007). A maior incidência de HCC ocorre na Ásia e África Sub-Saariana, devido à grande incidência das hepatites virais e alimentos contaminados por aflatoxina B1 (Sell, 2003; Bosch *et al.*, 2004; Newell *et al.*, 2008). Entretanto, no ocidente, a incidência do HCC está aumentando, possivelmente devido ao aumento no número de casos de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), cirrose relacionada à diabetes do tipo II e esteatohepatite não alcoólica (Sell, 2003; Bruix *et al.*, 2004).

A frequência do HCC apresenta grandes diferenças na população em virtude de diversos fatores de risco ambientais e/ou genéticos envolvidos na patogênese da doença. As infecções pelos vírus das hepatites B (HBV) e C consistem na etiologia predominante do

câncer primário de fígado. Outros fatores de risco incluem a ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas, consumo crônico de bebidas alcoólicas, hemocromatose, esteatose, radiação e a exposição a substâncias químicas como N-nitrosaminas e compostos N-nitrosos (Lim, 2002; Llovet; Burroughs; Bruix, 2003; Wu; Tang; Li, 2009). Estes fatores são conhecidos por gerarem modificações químicas nas bases do DNA, como ligações covalentes dos carcinógenos ao DNA (formação de adutos), oxidação de bases ou erro no reparo do DNA. Todas estas alterações levam a mutações em genes específicos, alguns dos quais críticos para o estabelecimento de neoplasias em animais e humanos (Lim, 2002).

1.2 Câncer e Hepatocarcinogênese

O estudo da carcinogênese hepática em animais está em constante evolução, porém, o desenvolvimento de modelos experimentais do HCC em animais com similaridades ao desenvolvimento do HCC observado em humanos é muito mais recente. Trabalhos desenvolvidos por James e Elizabeth Miller, Emmanuel Farber e, posteriormente, de Henry Pitot, não somente estabeleceram a carcinogenicidade hepática de muitas substâncias, mas também formularam hipóteses a respeito dos mecanismos da hepatocarcinogênese (Price *et al.*, 1952; Farber, 1963; Pitot, 1982).

Entre as importantes descobertas e conceitos gerados por estes autores, percebeu-se que a carcinogênese hepática é um processo em múltiplas etapas que envolvem diferentes alterações genéticas que levam à transformação maligna dos hepatócitos (Farber, 1984).

É bastante discutível o número exato de etapas que compõem o processo carcinogênico, existindo evidências de que a neoplasia ocorra em três estágios básicos cada

um tendo características morfológicas e moleculares distintas. Estes estágios são denominados iniciação, promoção e progressão e podem ser induzidos por agentes de natureza física (carcinogênese física), biológica (carcinogênese biológica) e química (carcinogênese química) (Pitot, 2001; Young; Yang; Colburn, 2003).

A primeira etapa, a iniciação, é causada por agentes que geram danos no DNA, atuando, portanto, por mecanismo genotóxico. Além disso, pode ocorrer oxidação das bases do DNA ou erros no processo de reparo do DNA que podem levar a mutações em genes específicos, como por exemplo, oncogenes e genes supressores de tumor (Watson; Cai; Jones, 2000; Weisburger, 2001). Essas mutações, caso não eliminadas pelo sistema de reparo, podem originar no genoma transições, transversões e pequenas deleções, que são fixadas no DNA após um ciclo de proliferação celular. Dessa forma, para que haja a formação da neoplasia, é necessário converter o dano químico em alterações herdáveis denominadas de mutações (Farber; Sarma, 1987; Pitot, 2001; Martinez *et al.*, 2003).

A segunda etapa é a promoção, que envolve a expansão clonal seletiva das células iniciadas pela ação de um agente promotor, formando assim lesões pré-neoplásicas (LPN) (Pitot, 2001). Nessa etapa os carcinógenos também podem atuar por mecanismo não-genotóxico, que envolve mudanças na expressão de diversos genes relacionados com o ciclo celular, diferenciação, inflamação e imunossupressão (Luch, 2005). Devido à característica de reversibilidade dessa etapa, um estímulo constante do agente promotor é de grande importância para que a carcinogênese progrida. Além de reversível, este estágio é longo, sendo, portanto, um ponto estratégico para a ação de agentes quimiopreventivos (Pitot, 2001).

Muitas LPN regredem e não evoluem para o câncer, enquanto outras adquirem capacidade de crescimento autônomo e progridem para nódulos neoplásicos e HCC (Feo *et al.*, 2006). Assim, cerca de 95-98% das LPN, sofrem remodelação, um processo altamente complexo envolvendo mudanças no suprimento sanguíneo e em características bioquímicas,

bem como na estrutura e arquitetura celulares, retornando ao aspecto “normal” anterior do fígado. Uma outra parte (2-5%) segue a persistência, adquire a capacidade de crescimento autônomo, o qual pode estar relacionado a um bloqueio no processo da remodelação, por meio da diferenciação celular (Farber, 1992) ou da apoptose (Shulte-Hermann *et al.*, 1990), e progride para nódulos neoplásicos e HCC (Higashi *et al.*, 2001; Feo *et al.*, 2006).

Dessa forma, a importância do fenômeno de remodelação evidencia-se pela prevenção da hepatocarcinogênese por compostos que induzem este processo, bem como pela sua implicação em alguns casos de regressão espontânea de nódulos e neoplasias hepáticas em humanos (Feo *et al.*, 2006).

A presença de LPN caracteriza os estágios iniciais da hepatocarcinogênese em humanos e em animais e pode ser útil para a identificação de marcadores neoplásicos, para o estudo da progressão do câncer e para estratégias quimiopreventivas (Pérez-Carréon *et al.*, 2006).

Essas lesões podem ser identificadas por meio da expressão alterada de enzimas hepáticas, como uma menor expressão de enzimas de fase I e uma maior indução de enzimas de fase II de biotransformação (Feo *et al.*, 2006). Várias enzimas hepáticas apresentam alterações na sua expressão, como a adenosina trifosfatase, glicose-6-fosfatase, γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) e glutathione-S-transferase na forma placentária (GST-P), que comumente são utilizadas como marcadores para suas identificações, bem como avaliação de seus números e dimensões por meio de análise de imagem computadorizada (Farber; Sarma, 1987; Bannasch; Zerban, 1990; Imai *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 2000; Ittrich *et al.*, 2003).

O estágio de progressão é estabelecido como uma transição do estágio de promoção e é caracterizado por sua instabilidade cariotípica e contínua evolução das características independentes, como mudanças bioquímicas nas células malignas, aumento da proliferação celular, invasão e metástases (Pitot; Dragan, 1991; Libbrecht *et al.*, 2005).

Assim como outras neoplasias, o HCC pode ser considerado uma doença complexa que resulta de alterações simultâneas em genes geralmente relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular (Parmigiani; Camargo, 2004). Assim, seu aparecimento está associado com a ocorrência de alterações genéticas que se acumulam progressivamente no material genético de uma célula normal. Mais recentemente, demonstrou-se que eventos epigenéticos também desempenham um importante papel na carcinogênese (Worm; Guldberg, 2002). Estes eventos podem ser definidos como alterações estáveis e potencialmente herdáveis na expressão gênica que não afetam a sequência de nucleotídeos do DNA, tais como a metilação do DNA, *imprinting* genômico e modificações em histonas como a acetilação (Jiang; Bressler; Beaudet, 2004). Dentre esses processos, destacam-se a hipermetilação das regiões promotoras de genes, principalmente dos denominados supressores de tumor, bem como a desacetilação de histonas, fenômenos que resultam em inibição da expressão gênica (silenciamento transcricional) (Esteller; Almouzni, 2005).

Dessa forma, a identificação e caracterização de genes alterados bem como de alterações epigenéticas na hepatocarcinogênese são fundamentais para a compreensão das bases moleculares da doença. Nos últimos anos, um grande avanço na identificação de genes relacionados ao desenvolvimento neoplásico foi alcançado e atualmente mais de 200 genes dessa categoria já estão caracterizados (Camargo; Parmigiani, 2008).

Atualmente, o avanço da tecnologia de arranjos de DNA (*macroarray* ou *microarray*), os quais são capazes de monitorar centenas e até milhares de genes simultaneamente, proporciona uma poderosa ferramenta para a análise genômica da carcinogênese (Suzuki *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2005; Masotti *et al.* 2010).

Considerando-se que variações na expressão gênica estão associadas ao desenvolvimento de determinadas doenças, é importante identificar os fenótipos moleculares

associados com o desenvolvimento de neoplasias, bem como, as vias moleculares envolvidas neste processo (Brown; Botstein, 1999).

Nesse contexto, espera-se que genes com expressão diferencial em células neoplásicas possam ser identificados e revelem respostas a terapias e estratégias de prevenção, podendo futuramente ser utilizados como uma espécie de assinatura molecular das neoplasias (Segal, 2007; Camargo; Parmigiani, 2008).

1.3 Modelo do Hepatócito Resistente

Embora haja várias diferenças interindividuais e entre espécies na hepatocarcinogênese, a carcinogênese hepática induzida quimicamente em ratos compartilha muitas características morfológicas, bioquímicas e moleculares com neoplásicas hepáticas em humanos (Feo *et al.*, 2006; Pérez-Carréon *et al.*, 2006; Andersen *et al.*, 2010). Isto indica que, independentemente dos fatores etiológicos, as mesmas classes de alvos genéticos estão envolvidas na gênese dessas lesões, e ainda, os mecanismos básicos da hepatocarcinogênese em diferentes espécies pode ser similar (Feo *et al.*, 2006).

Modelos experimentais para o desenvolvimento de focos pré-neoplásicos hepáticos em animais foram descritos há anos e nos remetem ao clássico modelo de carcinogênese hepática química de Solt e Farber, o modelo do “Hepatócito Resistente” (RH), descrito em 1976 (Solt; Farber, 1976) e modificado em 1987 (Semple-Roberts *et al.*, 1987).

Este modelo é capaz de produzir LPN e neoplásicas com características moleculares similares às observadas em seus equivalentes em humanos (Andersen *et al.*, 2010) e é considerado adequado para induzir elevada incidência de neoplasias, bem como para se

avaliar e comparar os efeitos de substâncias quimiopreventivas capazes de modular o processo da carcinogênese (Farber; Sarma, 1987; Oliveira *et al.*, 2001). O modelo baseia-se na hipótese de que o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) é capaz de inibir a proliferação da maioria dos hepatócitos normais, mas não dos hepatócitos resistentes que foram gerados durante a iniciação pela dietilnitrosamina (DEN), podendo rapidamente formar proliferações focais (focos e nódulos pré-neoplásicos) (Farber; Sarma, 1987; Pitot *et al.*, 1996).

Neste modelo, é administrada a DEN, o agente iniciador, e após duas semanas segue-se a aplicação de 2-AAF, para inibir a proliferação dos hepatócitos não iniciados. Uma hepatectomia parcial (HP) a 70% é realizada após o início da administração de 2-AAF para estimular a proliferação das células iniciadas pela DEN (Solt; Farber, 1976).

A DEN é um potente agente iniciante frequentemente utilizado em estudos de carcinogênese experimental e sua carcinogenicidade é relacionada à sua capacidade de alquilar a estrutura do DNA (Heindryckx; Colle; Vlierberghe, 2009). Primeiramente, a DEN é hidroxilada a hidroxilnitrosamina (Verna *et al.* 1996). Este passo de bioativação é dependente de NADPH e oxigênio e é mediado pelo citocromo P450. Após a quebra do acetaldeído, um íon etildiazônio é formado e reage com as bases do DNA formando O6-etil-guanina, o principal aduto associado à carcinogenicidade da DEN (revisado por Heindryckx *et al.* 2009).

Os efeitos mito inibitórios do 2-AAF são causados pela formação de metabólitos como N-aceto-2-acetilaminofluoreno, 2-nitrosofluoreno e N-hidroxi-2-aminofluoreno, os quais encontram-se reduzidos em hepatócitos de LPN quando comparados aos hepatócitos do *surrounding* (área ao redor das LPN sem alterações morfológicas). Estes metabólitos podem gerar diferentes adutos, causando maior distorção da estrutura do DNA e um eficiente bloqueio da replicação do DNA tanto *in vitro* como *in vivo* (Ohlson; Koroxenidou; Hallstrom, 1998).

Em diversos protocolos de hepatocarcinogênese a proliferação dos hepatócitos em focos e nódulos é bastante lenta, em geral assincrônica, necessitando muitas semanas, ou mesmo alguns meses, para que se formem nódulos hepáticos visíveis. Já no modelo do RH isso ocorre de forma rápida e sincronizada, de modo que LPN já podem ser observados macroscopicamente em uma ou duas semanas após a etapa de seleção/promoção inicial (Solt; Farber, 1976; Farber; Sarma, 1987).

Dessa forma, uma das características mais positivas do modelo do RH é a possibilidade de se distinguir as poucas LPN persistentes do grande número de LPN em remodelação.

Ao se analisar as modificações moleculares durante os estágios iniciais da carcinogênese, considera-se indispensável discernir adequadamente populações celulares, reconhecidas por microscopia, como por exemplo, aquelas oriundas de tecidos neoplásicos e, especialmente, pré-neoplásicos, daquelas provenientes de tecido hepático sem alterações morfológicas ao seu redor (Kanai *et al.*, 2000; Maggioni *et al.*, 2000; Ogawa *et al.*, 2005).

Assim, diversas técnicas de microdissecção foram desenvolvidas para a análise de cortes histológicos. Dentre elas, destaca-se uma técnica mecânica baseada na utilização de uma agulha que oscila ultrassonicamente e de uma micropipeta piezo-direcionada, para a rápida microdissecção histológica e aspiração da amostra em uma só etapa (Harsch *et al.*, 2001).

Visando-se a realização de experimentos envolvendo técnicas de biologia molecular mais sensíveis, considera-se relevante a microdissecção tecidual para se discernir adequadamente populações celulares, como por exemplo, aquelas oriundas de tecidos neoplásicos e, especialmente, pré-neoplásicos, daquelas provenientes do *surrounding* das LPN (Kanai *et al.*, 2000; Maggioni *et al.*, 2000).

A análise de modificações moleculares ocorridas já em lesões pré-neoplásicas, que representam etapas preliminares da progressão do tumor a partir de células normais para o câncer declarado, pode proporcionar informações em relação a alterações fundamentais subjacentes ao desenvolvimento do câncer (Emmert-Buck *et al.*, 1996).

1.4 Quimioprevenção do câncer com β -ionona

Em 1997, a *World Cancer Research Foundation* e o *American Institute for Cancer Research*, ressaltaram que a incidência de neoplasias malignas no mundo pode ser reduzida em 30% a 40%, por meio de modificações alimentares e em determinados estilos de vida. Essas organizações estipularam, ainda, em 2001, que a ingestão diária de no mínimo 400 g a 600 g de frutas e hortaliças reduz a incidência de uma variedade de neoplasias malignas em no mínimo 20%, desde que implementada por um período prolongado, proporcionando um grande impacto em estratégias de prevenção (Nowell; Ahn; Ambrosne, 2004). No entanto, a prevenção do câncer nunca pareceu ter tanta prioridade na saúde pública como vem sendo observado recentemente, fazendo com que órgãos como o NCI (*National Cancer Institute*) passe a destinar parte do seu orçamento especificamente para a prevenção e detecção precoce do câncer (Bode; Dong, 2009).

Desse modo, a quimioprevenção vem a ser uma estratégia promissora para o controle de neoplasias. Esse termo foi utilizado pela primeira vez por Michael Sporn, em 1976, como uma forma de se prevenir a doença por meio da administração de um ou mais compostos naturais ou sintéticos durante as etapas iniciais da carcinogênese, ou seja, nas fases de iniciação ou promoção e antes do estabelecimento da etapa de progressão (Sporn *et al.*, 1976).

Entre os diversos constituintes de alimentos que apresentaram ação quimiopreventiva em neoplasias, os isoprenóides vêm apresentando ação promissora na quimioprevenção da hepatocarcinogênese (Espindola *et al.*, 2005; Ong *et al.*, 2006; Cardozo *et al.*, 2011).

Os isoprenóides, largamente distribuídos em frutas, hortaliças e grãos de cereais, são uma classe de substâncias com mais de 23.000 constituintes, com estruturas de diferentes tamanhos, complexidades e funções (Bach, 1995; Mo; Elson, 1999; Edwards; Ericsson, 1999). Estes podem ser denominados isoprenóides “puros”, que são constituídos exclusivamente por múltiplos de unidades isoprênicas (unidades de 5 carbonos), como monoterpenos (duas unidades), sesquiterpenos (três unidades), diterpenos (quatro unidades), triterpenos (seis unidades), tetraterpenos (oito unidades) e politerpenos (n unidades), enquanto que aqueles denominados “mistos” apresentam apenas parte de suas moléculas derivada da via do mevalonato (Bach, 1995; Sacchettini, 1997; Elson *et al.* 1999).

Através da via do mevalonato é formado um número excepcional de isoprenóides, podendo-se citar dentre eles a β -ionona (BI) (Figura 1) – um sesquiterpeno presente na estrutura molecular do retinol, β -caroteno e ácido retinóico – encontrado em uvas e aromatizantes de vinhos (Stermer *et al.*, 1994).

Figura 1. Estrutura química do isoprenóide cíclico β -ionona. Fonte: Tatmam, Mo, 2002.

Diversos estudos têm observado atividades promissoras da BI na hepatocarcinogênese. A BI foi capaz de suprimir a proliferação de células B16 de melanoma, células MCF-7 e

MDA-MB-231 mamárias e SGC-7901 de adenocarcinoma gástrico humano (Elson, 1995; He *et al.*, 1997; Mo; Elson, 1999; Liu *et al.*, 2004). Liu *et al.* (2004) verificou também, que este composto foi capaz de influenciar metástases, por meio da hiperexpressão de inibidores de metaloproteinases 1 (TIMP-1) e 2 (TIMP-2), importantes reguladores da degradação da matrix extracelular. Já *in vivo*, a BI apresentou atividade quimiopreventiva em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH (Espindola *et al.*, 2005; Cardozo *et al.*, 2011). Nestes trabalhos, o tratamento com BI diminuiu o número de LPN consideradas persistentes, que progridem para o câncer, e induziu o processo de remodelação das LPNs, tanto quando administrada desde a fase de iniciação até a promoção (Espindola *et al.*, 2005), bem como quando administrada somente durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese (Cardozo *et al.*, 2011).

De forma geral, os compostos que atuam na fase de iniciação da carcinogênese – considerados agentes quimiopreventivos bloqueadores – evitam a ocorrência de mutações no DNA, inibindo a ativação de carcinogênicos e induzindo sua destoxificação por meio da modulação de enzimas de fase I e II, respectivamente; induzindo o sistema de reparo do DNA e sequestrando espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, os compostos que atuam nas fases de promoção e progressão – considerados agentes supressores – inibem a proliferação das células iniciadas e/ou induzem a apoptose, eliminando, dessa forma, células com danos no genoma (Wattenberg, 1996; Manson *et al.*, 2000; Kakizoe *et al.*, 2003).

Ambos os estudos realizados com a administração da BI durante a fase de iniciação e promoção ou somente promoção da hepatocarcinogênese, demonstraram uma relação entre a atividade quimiopreventiva da BI e a inibição da proliferação celular específica em LPN persistentes e em remodelação, bem como uma diminuição nas concentrações plasmáticas de colesterol total, sugerindo estes como importantes mecanismos de ação da substância (Espíndola *et al.*, 2005; Cardozo *et al.*, 2011).

Dessa forma, a constatação de que o isoprenóide BI é capaz de exercer atividade quimiopreventiva no modelo do RH (Espindola *et al.*, 2005; Cardozo *et al.*, 2011), faculta-nos uma constatação de fundamental importância para uma avaliação mais aprofundada da modulação da expressão gênica por parte desse isoprenóide em LPN hepáticas.

Sendo assim, neste trabalho, utilizando-se ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com BI ou OM especificamente durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese, foi avaliada a modulação da expressão gênica pela BI bem como alterações da expressão gênica inerentes ao próprio modelo de hepatocarcinogênese. Por meio do uso de técnicas de *macroarrays* e de microdissecção tecidual, foi analisada a expressão gênica em populações celulares distintas, possibilitando a obtenção de informações úteis relacionadas ao eventual mecanismo molecular pelo o qual age a BI em LPN e na quimioprevenção da hepatocarcinogênese.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão gênica diferencial em lesões pré-neoplásicas hepáticas de ratos tratados com o quimiopreventivo β -ionona (β I) e identificar alvos moleculares do composto bioativo de alimentos.

2.2 Objetivos Específicos

- analisar a classificação funcional dos genes diferencialmente expressos no fígado de ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com β -ionona durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese;
- selecionar os genes possivelmente envolvidos com a atividade quimiopreventiva da β -ionona, no fígado de ratos submetidos ao modelo do RH, durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese;
- validar a expressão diferencial dos genes selecionados, envolvidos com a atividade quimiopreventiva da β -ionona, especificamente em LPN persistentes, em remodelação, no tecido *surrounding* das LPN e no tecido hepático normal do fígado de ratos submetidos ao modelo do RH, e tratados durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese com β -ionona ou óleo de milho;

- avaliar pós-transcricionalmente a expressão dos genes envolvidos com a atividade quimiopreventiva da β -ionona e com expressão diferenciada em LPN persistentes, em remodelação e no *surrounding* das LPN, do fígado de ratos submetidos ao modelo do RH, e tratados durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese com β -ionona ou óleo de milho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de fígado de ratos de trabalho prévio onde foi observada a atividade quimiopreventiva da BI na fase de promoção da hepatocarcinogênese (Cardozo *et al.*, 2011). Para tanto, ratos Wistar (*rattus norvegicus*) machos foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”, segundo protocolo desenvolvido por Solt e Farber (1976) e modificado por Semple-Roberts *et al.* (1987), e tratados durante 4 semanas consecutivas com BI (16 mg/100 g de p.c.) dissolvida em óleo de milho (OM) (0,25 ml/100 g de p.c., Mazola) ou somente OM (0,25 ml/100 g de p.c.), constituindo o grupo controle, conforme delineamento experimental (Figura 2). As amostras de tecido hepático foram congeladas em nitrogênio líquido após a eutanásia dos animais e posteriormente armazenadas em freezer -80°C, para posterior extração de RNA, proteínas e confecção de cortes histológicos para a microdissecção de LPN persistentes, LPN em remodelação e *surrounding* das LPN.

Figura 2. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação das atividades quimiopreventivas da BI quando administrada durante 4 semanas consecutivas a ratos Wistar durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

3.1 Macro-arranjo de DNA (*Macroarray*)

A técnica de *macroarray* é uma importante ferramenta para uma análise semi-quantitativa da expressão gênica. A contribuição desta técnica depende da complexidade e da identidade da biblioteca de cDNA a partir do qual o arranjo é feito. Foi utilizada uma membrana de nylon (*Atlas Rat Toxicology 1.2 array*, Clontech, Palo Alto, CA), contendo 1176 sequências parciais ou completas de genes em fita simples de DNA, além de 9 genes controles para a realização da normalização dos valores obtidos. Esta membrana permite avaliar a expressão de genes relacionados a funções específicas, conforme classificação

funcional: antígenos de superfície celular, fatores de transcrição, ciclo celular, proteínas e receptores de adesão celular, proteínas do sistema imune, proteínas de transporte extracelular, oncogenes e genes supressores de tumor, proteínas de resposta ao stress, transportadores e canais de membrana, proteínas da matrix extracelular, metabolismo, modificações pós-tradução, tradução, proteínas associadas à apoptose, transporte e processamento de RNA, proteínas ligantes ao DNA e cromatina, receptores celulares, sinalização celular, efetores e moduladores intracelulares, *turnover* protéico, citoesqueleto, reparo, recombinação e síntese de DNA (lista completa dos genes disponível em <http://atlasinfo.clontech.com>).

3.1.1 Extração de RNA total

A extração do RNA do tecido hepático foi realizada por meio do *kit* Atlas Pure Total RNA Labeling System (Clontech, Palo Alto, CA), que se baseia no método de extração proposto por Chomczynski e Sacchi (1987), a fim de se obter o RNA extraído em solução compatível à requerida para a análise de *macroarray*, conforme a especificação do fabricante (Clontech, Palo Alto, CA). Um total de 3 animais por grupo experimental foi utilizado para a extração do RNA total do tecido hepático (Hokaiwado *et al.*, 2004). Cada amostra de tecido hepático foi inicialmente homogeneizada com solução desnaturante em uma proporção de 1 mL de solução para cada 100 mg de tecido. Após incubação em gelo (aproximadamente 5 a 10 minutos), foi realizada uma centrifugação a 15.000 g para remoção dos “debris” celulares. O sobrenadante foi removido e transferido a um novo tubo, para adição de fenol saturado e clorofórmio. Após incubação em gelo e centrifugação a 15.000 g, a fase aquosa da solução contendo RNA foi removida e o procedimento de extração com fenol e clorofórmio foi

repetido por duas vezes. A solução contendo o RNA foi adicionada de isopropanol e submetida à centrifugação a 15.000 g durante 15 minutos para a precipitação do RNA. Este precipitado foi lavado com etanol a 80% e ressuspendido em água livre de RNase, em volume necessário para garantir uma concentração final de 1 a 2 µg/µL. Todas as etapas de centrifugação e incubação foram realizadas a 4°C. Após a extração, as amostras de RNA foram tratadas com DNase afim de se remover qualquer DNA residual. O RNA foi armazenado a -80°C até sua utilização. A concentração de RNA das amostras foi determinada pela leitura da absorbância em 260 nm pelo espectrofotômetro NanoDrop (Nanodrop ND-1000, ThermoScientific), sendo a pureza determinada pela razão entre os valores de 260 nm e 280 nm. A qualidade do RNA obtido foi verificada em gel de agarose a 1,2% com *GelRed* (Biotium, CA, USA) (considerado satisfatória quando observada a integridade das bandas 28S e 18S), e por meio da razão espectrofotométrica entre DO260/DO280 (considerada satisfatória entre 1,8 e 2,0).

3.1.2 Síntese de cDNA marcado com isótopo radioativo

A partir do RNA obtido de animais tratados com BI, OM e de animais considerados “normais” (não submetidos ao modelo do RH), foram produzidas sondas de cDNA (DNA complementar), via transcrição reversa, conforme instruções do fabricante, na presença do nucleotídeo marcado [α -³²P]dATP (PerkinElmer, USA) permitindo assim sua posterior detecção. Para a síntese do cDNA, foram utilizados 30 µg de RNA total por grupo (mix de 10 µg de RNA total de cada animal, totalizando 3 animais por grupo [Hokaiwado *et al.*, 2004]). Os cDNAs foram sintetizados por meio da reação da transcriptase reversa, utilizando termo

ciclador (PCR), de acordo com as instruções do fabricante (Clontech, Palo Alto, CA). Basicamente, a reação ocorreu em 20 µL de uma mistura de transcrição reversa (RT), a 50°C e por 25 min. Essa mistura consistiu de: [α -³²P]dATP (3.000µCi/mmol), mistura de dNTP (5 mM de cada dCTP, dGTP, dTTP), tampão de reação (250mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCL, 15 mM MgCl₂), mistura de primer CDS (Clontech, Palo Alto, CA) e MMLV transcriptase reversa (Clontech, Palo Alto, CA). Em seguida, o cDNA marcado com o isótopo radioativo foi purificado em mini colunas cromatográficas (NucleoSpin, Clontech, Palo Alto, CA), procedimento essencial para eliminar nucleotídeos não incorporados durante a síntese, ou pequenos fragmentos de cDNA (<1kb).

3.1.3 Hibridização e aquisição de imagens

As sondas de cDNA marcadas com isótopo radioativo foram hibridizadas aos arranjos da membrana de *macroarray*. Assim, quanto maior a expressão de um gene em uma determinada condição, maior a intensidade do sinal derivado da sonda hibridizada na região do arranjo que contém esse gene (Siqueira *et al.*, 2004). Para tanto, as membranas foram inicialmente lavadas com água bidestilada autoclavada e transferidas para tubos de vidro, seguindo-se a pré-hibridização com a solução “ExpressHyb” (Clontech, Palo Alto, CA) e 0,5 mg de DNA de esperma de salmão desnaturado (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) durante 3 horas, com agitação constante. Após esse procedimento as sondas de cDNA marcadas com isótopo radioativo foram adicionadas à solução de pré-hibridização onde permaneceram por 16-20h, em temperatura de 68°C e agitação constante, garantindo o contato completo da membrana com a solução de hibridização.

Em seguida, as membranas foram lavadas com solução 2X SSC/1% SDS aquecida a 68°C, até resfriamento completo da solução (aproximadamente 30 minutos) e posteriormente expostas em filme fotográfico, dentro de cassete a -80°C. A revelação do filme fotográfico ocorreu no 10º dia após a exposição, quando se observou uma intensidade do sinal com qualidade satisfatória para análise.

As imagens dos filmes foram digitalizadas e analisadas com o auxílio do programa *Quantity One* (Bio-Rad v.4.3.6, Hercules, CA, USA). Por meio deste programa, obteve-se os dados referentes à hibridização de cada ponto (região da membrana contendo um único gene). Cada gene recebeu um valor numérico de acordo com sua respectiva intensidade na imagem. Após a quantificação dos sinais, o sinal de fundo presente em toda a membrana foi subtraído do valor referente a cada ponto. Os valores foram exportados para uma planilha do programa Microsoft Office Excel (Microsoft Office 2010), onde foram normalizados conforme a expressão média dos genes controles, eliminando-se assim a variabilidade da intensidade devido ao tempo de exposição ou a reação de marcação e produção dos cDNAs. Os valores de intensidade referentes a cada gene foram transformados em logaritmos (base 2), para estabilizar a variância entre os níveis de intensidade (Hester *et al.*, 2002). A análise dos padrões diferenciais de expressão gênica foi realizada por meio da razão da intensidade de cada gene do grupo BI pelo grupo OM, bem como do grupo OM pelo grupo N. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando apresentaram a razão $\geq 1,5$ (genes muito expressos) ou $\leq 0,5$ (genes pouco expressos). Informações relacionadas à função destes genes (classificação funcional) foram baseadas na base de dados *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org>).

O nível de similaridade do padrão de expressão gênica entre os grupos foi obtido por análise hierárquica de “clustering”, baseado na distância Euclideana, utilizando-se o software *Hierarchical Clustering Explorer 3.5* disponível em <http://www.cs.umd.edu/hcil/hce>.

3.2 Obtenção de cortes histológicos

Visando-se a realização do procedimento de microdissecção de LPN hepáticas e do *surrounding* (tecido ao redor das LPNs) das LPN, cortes de 20 μ m foram inicialmente obtidos a partir de fragmentos de fígado armazenados a -80°C , utilizando-se, para tanto, criostato 2800N (Reichert Jung, Alemanha) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP. Deu-se preferência a tecidos congelados àqueles incluídos em parafina, pois resultam em RNAs de melhor qualidade. A partir das lâminas com cortes histológicos de tecido hepático congelado, seguiu-se a marcação histoquímica para γ -GT (Rutenburg *et al.*, 1969), que possibilitou a identificação microscópica de LPN persistentes, em remodelação e do *surrounding* das LPN.

3.3 Marcação histoquímica para γ -GT

O método utilizado para a realização da marcação histoquímica para γ -GT foi adaptado e modificado de Rutenburg *et al.* (1969). As lâminas histológicas com tecido hepático congelado foram inicialmente submetidas à fixação em etanol 96% durante 10 minutos a -20° . Em seguida, foi aplicada solução contendo hidróxido de sódio 1N (Merck, Alemanha), dimetilsulfóxido (*Methyl sulfoxide*, Sigma Chemical Co., EUA), TRIS-HCL 25 mM pH 7.4, glicil-glicina (*Glycylglycine* cod. G1002, Sigma Chemical Co., EUA), fast blue (*Fast Blue bb salt* cod. F-3378-5G, Sigma Chemical Co., EUA) e o substrato ácido L-glutâmico-4-methoxi-beta-nafthilamida (*L-Glutamic Acid β naphthylamide* cod. G0141,

Sigma Chemical Co., EUA), durante 8 minutos à temperatura ambiente, ou até a visualização macroscópica e nítida das LPN, seguida de lavagem com NaCl 0,85% e CuSO₄ 0,1M. Os cortes histológicos foram desidratados com etanol 70%, seguido de etanol 85% e 100%, e armazenados a -80° por um período de tempo inferior a 20 dias para prosseguimento da microdissecção do tecido. Visando-se a posterior extração de RNA total deste tecido corado e microdissecado, bem como sua degradação a um mínimo aceitável, todas as soluções foram preparadas em água tratada com dietil-pirocarbonato e todo o procedimento de marcação histoquímica foi otimizado para um tempo inferior a 30 minutos.

3.4 Microdissecção de LPN persistentes, LPN em remodelação e *surrounding* das LPN do tecido hepático

O sistema de microdissecção (Figura 3) consiste, basicamente, na oscilação ultrassônica de uma agulha, promovendo a remoção das células desejadas, de uma micropipeta piezo-direcionada, permitindo a aspiração do tecido microdissecado, e de um equipamento eletrônico para controlar tudo simultaneamente (MicroDissector modelo PPMD, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). As duas ferramentas, ou seja, a agulha e a micropipeta, estão conectadas a micromanipuladores motorizados controlados por “joystick” e que possibilitam sua movimentação tridimensional (TransferMan NK2, Eppendorf AG), adaptados a um microscópio invertido trinocular com platina mecânica, modelo Axiovert 40 C (Carl Zeiss, Alemanha).

Figura 3. Foto do equipamento de microdissecção. Por meio da utilização de uma agulha ultrassônica, a área de interesse do tecido é fragmentada em partículas celulares, que são aspiradas para o interior de micropipeta.

A microdissecção foi realizada basicamente de acordo com Harsch *et al.* (2001). As etapas da microdissecção podem ser observadas na Figura 4. Os cortes foram inicialmente recobertos com 50 μ L de etanol (99,5% Synth, Brasil), localizando-se, em seguida, a área de interesse a ser dissecada. A seguir, a frequência e amplitude da agulha de microdissecção foram devidamente ajustadas (de 25 a 55 kHz e de 0 a 2 μ m), observando-se a interação da mesma com o tecido. A micropipeta equipada com ponteira GELoader com filtro MDS (Eppendorf AG, Alemanha) possibilitou, então, a aspiração contínua das partículas de tecido geradas e do etanol, devendo ser posicionada próxima (máximo 400 μ m) da área a ser dissecada. A lesão tecidual é evitada, graças à elasticidade dessa ponteira. A taxa de aspiração do etanol foi regulada na unidade de controle e ajustada à velocidade de microdissecção.

Após a dissecção, o etanol contendo as partículas de tecido geradas foi, então, transferido para um tubo de microcentrífuga, por meio da própria micropipeta de aspiração sendo agora utilizada em seu modo de ejeção (Harsch *et al.*, 2001).

Figura 4. Fotomicrografias de lesão pré neoplásica persistente hepática marcada histoquimicamente para γ -GT, coberta com etanol, a ser microdissecada (1) e das etapas da microdissecção (2, 3, 4). Nas etapas de microdissecção, pode-se observar a localização e início de contorno de uma LPN persistente marcada positivamente para γ -GT (2), a visualização do tecido hepático microdissecado (3) e a aspiração do tecido suspenso em etanol (4) (Fotos obtidas com objetiva de 5X).

3.5 Extração de RNA a partir do tecido hepático microdissecado

Para a extração de RNA total, os fragmentos microdissecados de LPN persistentes, LPN em remodelação e do *surrounding* das LPN foram concentrados após evaporação do etanol em um concentrador a vácuo SS32 Speed Vac (Savant, NY, USA). A extração do RNA foi realizada por meio do *kit* NORGEN (NORGEN Biotek Corporation, Ontario, Canada), que se baseia na solubilização do tecido microdissecado em solução de lise, contendo detergentes e um desnaturante caotrópico para inativar RNAses. A partir da solubilização do tecido, a purificação do RNA ocorreu pelo uso de mini colunas cromatográficas com uma resina específica para a separação dos ácidos nucleicos. Basicamente, a solução contendo os ácidos nucleicos foi injetada nas mini colunas e submetida à centrifugação a 16.000 g durante 2 minutos a 4°C. Em seguida, foi adicionada à mini coluna uma solução de lavagem (NORGEN Biotek Corporation, Ontario, Canada) e realizada uma centrifugação a 16.000 g durante 2 minutos a 4°C. A seguir, foi adicionada à mini coluna uma solução de eluição de RNA (NORGEN Biotek Corporation, Ontario, Canada) e novamente realizada uma centrifugação a 14.000 g durante 2 minutos a 4°C obtendo-se a eluição do RNA total.

Após a extração, o RNA total foi quantificado por meio de espectrofotômetro NanoDrop (Nanodrop ND-1000, ThermoScientific). A qualidade do RNA obtido foi verificada em gel de agarose a 1,2% com *GelRed* (Biotium, CA, USA) (considerado satisfatório quando observamos a integridade das bandas 28S e 18S), e por meio da razão espectrofotométrica entre DO260/DO280 (considerada satisfatória entre 1,8 e 2,0). Até o momento de sua utilização, o RNA foi armazenado em freezer a -80°C.

3.6 Análise da expressão gênica por meio da Reação em Cadeia de Polimerase - Transcriptase Reversa Duplex (RT-PCR Duplex)

Os resultados obtidos por meio do *macroarray* foram validados por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase - Transcriptase Reversa duplex (RT-PCR duplex). Para tanto, foram selecionados genes considerados potenciais alvos da ação quimiopreventiva da BI na hepatocarcinogênese. A escolha destes genes obedeceu aos seguintes critérios: expressão diferenciada no grupo BI em relação ao grupo OM e possível participação em eventos biológicos envolvidos na quimioprevenção da hepatocarcinogênese pela BI.

A análise da expressão dos genes RXR α , RAR β , COUP-TFI e Nur77 a partir do RNA extraído após a microdissecção das LPN persistentes e em remodelação positivas para γ -GT e do *surrounding*, foi realizada por RT-PCR duplex, basicamente conforme descrito por Kim *et al.* (2003). Como controle positivo e controle endógeno (gene normalizador), avaliou-se a expressão do gene de rato GAPDH (Abe *et al.*, 2002) ou β -actina (Dhingra, Bansal, 2006).

Para tanto, logo de início a síntese de cDNA a partir de RNA total (500 ng) ocorreu em 20 μ L de uma mistura de transcrição reversa (RT), a 40°C e por 90 min. Essa mistura consistiu de: KCl 50 mM; Tris-HCL 10 mM (pH 8,3); MgCl₂ 5 mM; 0,25 U de transcriptase reversa C-Master RT enzyme (Eppendorf AG; Alemanha), 1 U de inibidor de RNase, iniciador oligo-dT 0,125 pM e mistura de dNTP 1 mM. As reações de amplificação por PCR com um quinto do produto da transcrição reversa foram realizadas em solução contendo: KCL 50 mM; Tris-HCL 10 mM (pH 8,3); MgCl₂ 2,5 mM; oligos iniciadores direito 5' 20 pmol; oligos iniciadores reverso 3' 20 pmol e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Eppendorf AG, Alemanha).

Inicialmente, foram testados múltiplos ciclos (tempos e temperaturas de desnaturação, associação, extensão e extensão final) em termociclador Eppendorf epMastercycler “S” com gradiente de temperatura (Eppendorf AG, Alemanha), no sentido de se determinar aquelas condições ideais de PCR para cada gene. Assim, foi inicialmente determinado o ciclo em que uma amostra apresentando a maior expressão alcançou um platô de amplificação, adotando-se, um número de ciclos menor do que este que foi determinado, em fase exponencial da amplificação. As sequências dos oligos iniciadores utilizados, bem como as respectivas temperaturas de anelamento e tamanho final dos produtos, encontram-se descritos na Tabela 1.

Ressalta-se que foi possível realizar a co-amplificação (RT-PCR *duplex*) dos genes de interesse (RXR α , RAR β , Nur77 e COUP-TFI) e de um gene normalizador (GAPDH ou β -actina), permitindo uma maior confiabilidade dos resultados obtidos, uma vez que a expressão gênica de cada animal foi avaliada por meio de uma mesma reação de amplificação, controlando-se a interferência de possíveis falhas técnicas e pessoais que poderiam levar a diferenças entre reações de amplificação realizadas em momentos distintos e consequentes valores alterados da expressão do gene de interesse ou do gene controle.

Os cDNAs amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com *GelRed* (Biotium, CA, USA) a 80V por aproximadamente 1 hora. Após, o gel foi exposto à luz UV possibilitando avaliar e fotografar as bandas dos genes amplificados, bem como determinar sua intensidade por meio de um sistema de análise de imagens baseado em densitometria (MultiDoc-IT Imaging System, UVP, Canada, USA), utilizando-se o programa Quantity One (Bio-Rad v.4.3.6, Hercules, CA, USA). Os sinais foram quantificados em unidades arbitrárias e os dados obtidos normalizados utilizando-se a quantificação dos genes normalizadores.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores dos transcritos dos genes alvo, tamanho do produto e temperatura de anelamento, utilizados para análise de transcriptase reversa RT-PCR Duplex.

Gene	Sequência dos Oligonucleotídeos Iniciadores	Tª de anelamento	Tamanho do produto	Referências
β-actina*	direito 5' CGTTGACATCCGTAAAGACCTCTA 3' reverso 5' TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC 3'	56-60°C	290 pb	Perepechaeva <i>et al.</i> , 2006
GAPDH*	direito 5' GTTGCCATCAACGACCCCTTC 3' reverso 5' GGATGCAGGGATGATGTTCTG 3'	60°C	536 pb	Lee <i>et al.</i> , 2001
RXRα	direito 5' CCTGCCGTGACAACAAGGA 3' reverso 5' CACTTCTGGTATCGGCAGTACTG 3'	56°C	60 pb	Yang-Yi <i>et al.</i> , 2003
RARβ	direito 5' TGTCAGGAATGACAGGAACAAG 3' reverso 5' AGCACTGGAATTCGTGGTGTAT 3'	60°C	192 pb	Itoh <i>et al.</i> , 2009
COUP-TFI	direito 5' ATGCACTCACAAACGGGGAT 3' reverso 5' ACTGTGCGAAGAGAGGGCAAT 3'	60°C	427 pb	Buholzer <i>et al.</i> , 2005
NUR77	direito 5' TCTGCTCAGGCCTGGTGCTACTAC 3' reverso 5' GGCACCAAGTCCTCCAGCTTGTTG 3'	58°C	358 pb	Maruyama <i>et al.</i> , 1995

Legenda: * gene normalizador; pb = pares de base

3.7 Análise da expressão de RAR β por meio de western blot

3.7.1 Preparação dos extratos protéicos

Para extração das proteínas nucleares do tecido hepático, foram utilizados reagentes para extração nuclear NE-PER (Pierce, Rockford). O método consiste na lise celular a base de detergentes, com isolamento por centrifugação das frações protéicas nucleares e citoplasmáticas. Para quantificação da concentração de proteínas, foi utilizado o método de

absorção ultravioleta (UV). Esse método está baseado no fato de que proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm (UV). Para tanto, utilizou-se aparelho Gene-Quant Pro (Amersham Pharmacia Biotec, EUA) ajustado para leitura a 280 nm. A concentração de proteínas foi determinada a partir de curva padrão de albumina (concentração de 0 a 4000 µg/mL).

3.7.2 Western blot

Os extratos de proteína hepática foram submetidos separadamente à eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE) a 15% e tampão Tris-glicina 1X (Método de Laemmli). As proteínas foram então transferidas por meio de eletroforese do gel para membrana de nitrocelulose Hybond-CTM (Amersham Biosciences, EUA), com poro de diâmetro de 0,20 µm, no decorrer de 30 minutos. O bloqueio da membrana de nitrocelulose foi feito reagentes de bloqueio ECL (Amersham Biosciences, EUA), durante uma noite a 4° C. A membrana foi lavada em PBS-T e incubada com o anticorpo primário anti-RARβ (Upstate, EUA) (na diluição de 1:1000), por duas horas à temperatura de 37°C. Após nova lavagem com PBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP), e a imunodeteção foi feita utilizando-se o sistema de quimioluminescência ECL (Amersham Pharmacia Biotec). A membrana foi exposta a filme de raios-X, resultando em bandas de 51 kDa, o que corresponde ao peso molecular esperado da proteína RARβ. Para se quantificar as intensidades das bandas, utilizou-se o sistema de captura e análise de imagens *Image Quant 400* (GE Healthcare). Os sinais foram quantificados em unidades arbitrárias.

Como controle para normalização, o mesmo processo foi realizado, porém incubando-se a membrana com anticorpo primário anti- β -actina (Sigma, EUA) (na diluição de 1:1000), por uma hora à temperatura ambiente, e com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP).

3.8 Análise Estatística

Para a realização da análise estatística utilizou-se o programa Statistica 8.0 (Statsoft). Todos os dados foram testados quanto à distribuição normal (teste de Kolmogorov e Smirnof) e à homogeneidade de variância (teste de Bartlett). As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas pelo teste one-way ANOVA, seguido do de Duncan. Para análises de correlação foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Em todos os casos, o nível de confiança adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Análise do perfil de expressão gênica

Na Figura 5, observa-se as imagens digitalizadas das membranas de *macroarray* após hibridização com cDNA hepático e exposição em filmes de raio-X. A partir destas imagens, foram realizadas as análises semi-quantitativas da expressão gênica.

A.

B.

C.

Figura 5. Membranas de *macroarray* após hibridização com sonda de cDNA hepático marcada com fósforo 32 e exposição em filme de raio-X. A) Hibridização com cDNA produzido a partir do RNA do tecido hepático de animais do grupo N. B) Hibridização com cDNA produzido a partir do RNA do tecido hepático de animais do grupo OM. C) Hibridização com cDNA produzido a partir do RNA do tecido hepático de animais do grupo BI.

A partir da digitalização das imagens obtidas com o *macroarray*, foi possível analisar globalmente o perfil de expressão gênica dos diferentes grupos experimentais. Como se observa na Figura 6, observou-se um padrão de expressão gênica diferente entre os grupos experimentais. Por meio da análise de *clustering* hierárquico, foi possível se detectar a existência de grupos de genes com expressão similar entre os grupos experimentais.

Figura 6. Clusters obtidos por análise hierárquica baseado na distância Euclidiana da expressão dos genes dos grupos N, OM e BI. A expressão diferencial está representada em uma matriz: cada linha representa um único gene e cada coluna um grupo experimental. A abundância dos transcritos é representada pela cor da célula correspondente na matrix. A barra de cores representa a variação da expressão: verde indica uma menor expressão enquanto vermelho indica uma maior expressão.

Por meio da análise de correlação de Pearson entre os grupos experimentais (Figura 7), observou-se uma correlação positiva entre o perfil de expressão gênica dos grupos BI e OM, sugerindo uma similaridade no perfil de expressão dos genes avaliados. Já entre os grupos N e OM, bem como BI e N, a correlação encontrada foi fracamente positiva, sugerindo pouca similaridade no perfil de expressão gênica entre estes grupos.

Figura 7. Correlação de Pearson observada entre os diferentes grupos experimentais. Correlação entre os grupos N e BI (A), correlação entre os grupos OM e BI (B) e correlação entre os grupos N e OM (C).

Para identificar os genes relacionados à quimioprevenção da hepatocarcinogênese pela BI, o perfil de expressão gênica dos animais tratados com BI foi comparado ao dos animais do grupo OM. Além disso, o perfil de expressão gênica do grupo OM foi comparado ao do grupo N, afim de se identificar os genes diferencialmente expressos no modelo de hepatocarcinogênese do RH. Como pode-se observar no Diagrama de Venn (Figura 8), o número de genes diferencialmente expressos entre os grupos OM/N e BI/OM foi de 133 e 32 genes, respectivamente. Dentre os genes diferencialmente expressos no grupo OM, 67 genes apresentaram-se com expressão aumentada, enquanto 64 genes apresentaram-se com a expressão diminuída. No grupo BI, 22 genes apresentaram-se com expressão aumentada, enquanto 10 genes apresentaram-se com a expressão diminuída. O diagrama de Venn permite também visualizar a classificação dos genes cuja expressão foi alterada especificamente ou em comum para cada tratamento. A lista completa de todos os genes, com suas respectivas informações, encontra-se nos Anexo de 1 a 4.

Figura 8. Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos. Genes diferencialmente expressos grupo OM em relação ao grupo N (OM/N) e no grupo BI em relação ao grupo OM (BI/OM).

Os genes diferencialmente expressos foram classificados de acordo com sua principal função celular. Em relação aos genes diferencialmente expressos no grupo BI (Tabela 2), a maior proporção dos genes foi relacionada aos receptores celulares (12 genes, 37,5%), seguida dos genes relacionados ao metabolismo (06 genes, 18,75%) e dos genes envolvidos com o *turnover* de proteínas (05 genes, 15,63%).

Tabela 2. Classificação funcional dos 32 genes diferencialmente expressos no grupo BI em relação ao grupo OM.

Classificação funcional	nº de genes	% dos genes
Ciclo celular	1	3,13
Metabolismo	6	18,75
Não Classificado	2	6,25
Proteínas de resposta ao estress	1	3,13
Proteínas de sinalização celular e comunicação extracelular	1	3,13
Proteínas de transporte extracelular	1	3,13
Receptores celulares	12	37,50
Transdução	2	6,25
Transportadores e canais de membrana	1	3,13
<i>Turnover</i> de proteína	5	15,63
	32	100%

De acordo com a principal função dos genes diferencialmente expressos no grupo OM (Tabela 3), novamente a maior proporção dos genes foi relacionada aos receptores celulares (33 genes, 24,81%), seguida dos genes relacionados ao metabolismo (32 genes, 24,06%) e genes relacionados ao *turnover* de proteínas (12 genes, 9,02%).

Tabela 3. Classificação funcional dos 133 genes diferencialmente expressos no grupo OM em relação ao grupo N.

Classificação funcional	Nº de genes	% dos genes
Ciclo celular	3	2,26
Metabolismo	32	24,06
Não classificado	13	9,77
Oncogenes e supressores de tumor	1	0,75
proteínas associadas à apoptose	3	2,26
Proteínas de ligação no DNA e cromatina	1	0,75
Proteínas de modificação pós traducional	1	0,75
Proteínas de resposta ao estress	7	5,26
Proteínas de sinalização celular e comunicação extracelular	3	2,26
Proteínas de tráfego/alvo	1	0,75
Proteínas de transporte extracelular	5	3,76
Proteínas/Receptores de adesão celular	3	2,26
Receptores celulares	33	24,81
Síntese, recombinação e reparo do DNA	2	1,50
Transcrição	2	1,50
Transdução	3	2,26
Transdutores, efetores e moduladores intracelular	3	2,26
Transportadores e canais de membrana	5	3,76
<i>Turnover</i> de proteína	12	9,02
	133	100%

Dentre os 32 genes diferencialmente expressos no grupo BI, foram selecionados 4 genes para mais análises, pertencentes à classe de receptores nucleares, por serem considerados genes possivelmente relacionados ao mecanismo de ação quimiopreventivo da BI: genes RAR β , RXR α , COUP-TFI e Nur77.

Como se pode observar na Tabela 4, os genes RXR α e RAR β encontraram-se com a expressão aumentada (razão > 1,5) no grupo BI em relação ao grupo OM enquanto os genes COUP-TFI e Nur77 apresentaram-se com expressão diminuída (razão < 0,5) neste grupo. Em

relação ao processo da carcinogênese, somente dois dos genes selecionados apresentaram a expressão diminuída no grupo OM em relação ao grupo N: RXR α e RAR β . Os genes COUP-TFI e Nur77 não apresentaram sua expressão alterada no grupo OM.

Tabela 4. Genes, razão da expressão gênica e classificação funcional dos genes diferencialmente expressos no grupo BI em relação ao grupo OM.

Gene bank	Nome de gene	Razão OMXN	Razão BIXOM	Classificação funcional
L06482	Retinoid X receptor α (RXR α)	0,47	1,86	Receptores celulares
M81766	Retinoic acid receptor β (RAR β)	0,41	1,78	Receptores celulares
D38530	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 ou Nur77	0,93	0,33	Receptores celulares
U10995	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1 ou COUP-TFI	0,54	0,10	Receptores celulares

4.2 Validação da expressão gênica por RT-PCR duplex

Considerando-se que a metodologia de *macroarray* avalia a expressão gênica em larga escala e com alta complexidade, é necessária a validação da expressão de cada gene individualmente por meio de outras metodologias. Nesse sentido, a validação da expressão gênica diferenciada dos quatro genes selecionados foi realizada por meio da técnica RT-PCR *duplex*, utilizando-se regiões microdissecadas do tecido hepático: LPN persistentes, LPN em remodelação e *surrounding* das LPN.

Ao se validar a expressão do gene RXR α por meio da técnica de RT-PCR duplex, observou-se que sua expressão foi maior ($p>0,05$) no grupo BI em relação ao grupo OM, especificamente, nas LPN persistentes, validando o resultado obtido por meio da análise de *macroarray*. No entanto, diferentemente do observado na análise de *macroarray*, a expressão desse gene não diferiu no grupo OM em relação ao grupo N (Figura 9).

Figura 9. RT-PCR duplex dos genes RXRα e β-actina. (A) Expressão dos genes RXRα e β-actina em tecido hepático normal, surrounding e lesões pré-neoplásicas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. (B) Quantificação da expressão hepática de RXRα, normalizada pela expressão do gene β-actina, no tecido hepático normal, surrounding e em lesões pré-neoplásicas hepáticas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. Valores expressos em média ± erro padrão da média de 4 animais por grupo. Legenda: PM=padrão de peso molecular; N=normal; S=surrounding das LPN; pLPN=lesões pré-neoplásicas persistentes; rLPN=lesões pré-neoplásicas em remodelação.

^a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a pLPN do grupo OM, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido do de DUNCAN.

Ao se validar a expressão do gene RAR β , observou-se que sua expressão foi maior ($p < 0,05$) no grupo BI em relação ao grupo OM, especificamente nas LPN em remodelação. No entanto, diferentemente do resultado observado pela análise de *macroarray*, a expressão de RAR β no grupo OM não diferiu da expressão observada no grupo N (Figura 10).

Figura 10. RT-PCR duplex dos genes RAR β e GAPDH. (A) Expressão dos genes RAR β e GAPDH em tecido hepático normal, surrounding e lesões pré-neoplásicas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. (B) Quantificação da expressão hepática de RAR β , normalizada pela expressão do gene GAPDH, no tecido hepático normal, surrounding e em lesões pré-neoplásicas hepáticas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 animais por grupo. Legenda: PM=padrão de peso molecular; N=normal; S=surrounding das LPN; pLPN=lesões pré-neoplásicas persistentes; rLPN=lesões pré-neoplásicas em remodelação.

^adiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a rLPN do grupo OM, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido do de DUNCAN.

Ao analisar a expressão do gene Nur77, observou-se uma diminuição ($p < 0,05$) na expressão desse gene especificamente nas LPN em remodelação do grupo BI, validando os resultados observados por meio da análise de *macroarray*. Ao avaliar a expressão de Nur77 no grupo OM em relação ao grupo N, observou-se uma expressão aumentada ($p < 0,05$) no *surrounding* das LPN e nas LPN em remodelação (Figura 11).

Figura 11. RT-PCR duplex dos genes Nur77 e β -actina. (A) Expressão dos genes Nur77 e β -actina em tecido hepático normal, surrounding e lesões pré-neoplásicas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. (B) Quantificação da expressão hepática de Nur77, normalizada pela expressão do gene β -actina, no tecido hepático normal, surrounding e em lesões pré-neoplásicas hepáticas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 animais por grupo. Legenda: PM=padrão de peso molecular; N=normal; S=surrounding das LPN; pLPN=lesões pré-neoplásicas persistentes; rLPN=lesões pré-neoplásicas em remodelação.

^a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo N, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido do de DUNCAN.

^b diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a rLPN do grupo OM, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido do de DUNCAN.

Novamente validando os resultados obtidos no *macroarray*, o tratamento com BI levou à uma diminuição ($p < 0,05$) da expressão do gene COUP-TFI, especificamente em LPN persistentes e em LPN em remodelação. Além disso, a expressão de COUP-TFI encontrou-se aumentada ($p < 0,05$) no grupo OM em comparação ao grupo N, tanto no *surrounding* das LPN como nas LPN persistentes e nas LPN em remodelação.

Figura 12. RT-PCR duplex dos genes COUP-TFI e β -actina. (A) Expressão dos genes COUP-TFI e β -actina em tecido hepático normal, surrounding e lesões pré-neoplásicas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. (B) Quantificação da expressão hepática de COUP-TFI, normalizada pela expressão do gene β -actina, no tecido hepático normal, surrounding e em lesões pré-neoplásicas hepáticas microdissecadas de fígado de ratos dos grupos OM ou BI. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 animais por grupo. Legenda: PM=padrão de peso molecular; N=normal; S=surrounding das LPN; pLPN=lesões pré-neoplásicas persistentes; rLPN=lesões pré-neoplásicas em remodelação.

^a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo N, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido do de DUNCAN.

^b diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação à respectiva LPN no grupo OM, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido do de DUNCAN.

4.3 Expressão de RAR β por western blot

Por meio da análise de western blot foi observado que o tratamento com BI promoveu um aumento ($p<0,05$) na expressão da proteína RAR β no tecido hepático (Figura 13).

Figura 13. Western blot das proteínas RAR β e β -actina. (A) Western blot das proteínas RAR β e β -actina realizado com proteína hepática do fígado de ratos dos grupos N, OM ou BI. (B) Quantificação da expressão hepática de RAR β , normalizada pela expressão de β -actina, no tecido hepático dos grupos N, OM ou BI. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 6 animais por grupo. Legenda: N=normal; OM=grupo controle; BI=grupo BI.

^a diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo OM, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido do de DUNCAN.

5. DISCUSSÃO

A quimioprevenção do câncer é de grande importância na prevenção ou mesmo na reversão em qualquer um dos estágios da carcinogênese: iniciação, promoção ou progressão. Neste sentido, a BI, um isoprenóide cíclico, tem demonstrado atividade quimiopreventiva em diversos estudos *in vitro* e, mais recentemente, *in vivo*, quando administrada tanto nos estágios da iniciação e promoção (Espíndola *et al.*, 2005), como quando administrada somente durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese (Cardozo *et al.*, 2011).

Nos diferentes modelos experimentais, as ações anti-neoplásicas da BI diferem conforme o tipo de célula estudada *in vitro* e seus mecanismos de ação ainda não estão bem compreendidos. Da mesma forma, no modelo *in vivo* de hepatocarcinogênese do RH, o mecanismo pelo qual a BI exerce seus efeitos quimiopreventivos ainda não está elucidado. Entretanto, as ações da BI parecem estar relacionadas à ação supressora da carcinogênese, reforçando seu potencial como um quimiopreventivo da hepatocarcinogênese (Cardozo *et al.*, 2011).

Dessa forma, a identificação das alterações moleculares precoces que ocorrem na hepatocarcinogênese é importante não somente para a detecção de neoplasias, mas principalmente para estratégias de quimioprevenção. O uso de plataformas de avaliação da expressão gênica diferencial tem possibilitado o melhor entendimento das ações moleculares de compostos de alimentos no contexto da quimioprevenção do câncer (Segal *et al.*, 2007). No presente estudo, utilizou-se plataforma *macroarray* que possibilitou o estudo de 1.176 genes relacionados a importantes processos associados à carcinogênese como, por exemplo, aqueles relacionados à proliferação, morte e sinalização celular.

Por meio da análise de *macroarray* foi possível identificar os genes diferencialmente expressos nos animais submetidos à hepatocarcinogênese (grupo OM, controle), bem como nos animais submetidos à hepatocarcinogênese e tratados com BI. De acordo com a análise hierárquica de *clustering* foi observado padrão similar na expressão gênica entre os grupos submetidos à hepatocarcinogênese (grupos OM e BI), diferindo ambos do perfil de expressão gênica dos animais considerados “normais”, possivelmente em decorrência das alterações genéticas relacionadas ao desenvolvimento da hepatocarcinogênese.

A estratificação dos genes diferencialmente expressos em grupos conforme sua função celular permitiu identificar as principais funções que as células hepáticas, após tratamento com OM ou BI, estão desempenhando. Foi observada distribuição dos genes diferencialmente expressos em 18 classes funcionais; no entanto, três delas se destacaram frente aos genes modulados pelo processo da carcinogênese: genes codificadores de receptores celulares (24,8%), genes relacionados ao metabolismo celular (24,6%) e genes relacionados ao *turnover* de proteínas (9%). De forma similar, dentre os genes modulados pela BI, destacaram-se os genes codificadores de receptores celulares (37,5%), genes relacionados ao metabolismo celular (18,7%) e os genes relacionados ao *turnover* de proteínas (15,6%).

A identificação de alterações na expressão de genes relacionados à codificação de receptores celulares, metabolismo celular e *turnover* de proteínas, confirmam alguns estudos encontrados na literatura. Pérez-Carreón *et al.* (2006) ao avaliar a expressão gênica de ratos F344 submetidos ao modelo do RH, utilizando a membrana comercial *Atlas Rat Toxicology 1.2 array* (Clontech, Palo Alto, CA), comparou LPN microdissecadas, marcadas positivamente para γ -GT ao tecido hepático de animais normais, identificando alterações na expressão de genes relacionados ao metabolismo, seguidas de receptores celulares e de genes de transdução intracelular. Dentre estes, foram ressaltados genes com expressão diferenciada, relacionados ao metabolismo e destoxificação de substâncias, como genes da família GSTs,

enzimas da família do citocromo P450, bem como genes relacionados aos processos de proliferação celular, como a ciclina D1 e proteína inibidora de NFκB. Estudos realizados por Suzuki *et al.* (2004) e Ogawa *et al.* (2005) observaram que os genes com expressão diferenciada em LPN de ratos F344 submetidos ao modelo do RH estavam principalmente relacionados ao metabolismo celular.

Nesse sentido, sugere-se que os genes envolvidos com o metabolismo celular e com receptores celulares são relevantes desde os estágios iniciais da hepatocarcinogênese induzida em ratos pelo modelo do RH, destacando-se como importantes alvos para a ação de substâncias com ação quimiopreventiva.

Por conta da importância de receptores nucleares no controle de programas transcricionais, bem como de sua desregulação no processo de desenvolvimento neoplásico, optou-se por focar, dentre os genes modulados pela BI, aqueles que codificam para receptores nucleares de retinóides: o receptor para o ácido retinóico β (RARβ), e o receptor X de retinóide α (RXRα), e receptores nucleares órfãos: receptores Nur77 e o COUP-TFI (Mangelsdorf, Evans, 1995).

Estudos têm sugerido que a repressão dos receptores de retinóides RARβ e RXRα, é um evento crítico em estágios iniciais da hepatocarcinogênese (Yang-Yi *et al.*, 2003; Osada *et al.* 2006; Xu, 2007; Ando *et al.*, 2007). A análise da expressão gênica diferencial pela plataforma *macroarray* sugere a ocorrência de diminuição na expressão de RARβ e RXRα, já nas etapas pre-neoplásicas da hepatocarcinogênese (grupo OM). No entanto, apesar dos resultados da expressão gênica obtida por RT-PCR duplex apontarem neste sentido, não houve diminuição na expressão dos genes que codificam para RARβ e RXRα nos estágios iniciais do modelo do RH.

Conforme a análise pela plataforma *macroarray*, o gene que codifica para o RARβ apresentou expressão hepática aumentada no grupo BI. A validação da expressão desse gene,

realizada por RT-PCR duplex, demonstrou aumento da expressão de RAR β especificamente em LPN em remodelação de animais tratados com BI, sugerindo o envolvimento desse receptor no processo de remodelação das LPN induzida pela BI. A expressão hepática aumentada de RAR β foi observada também por meio de *western blot*, sugerindo que este receptor é um importante alvo molecular da BI na supressão da hepatocarcinogênese.

O aumento na expressão de RAR β pode ainda estar relacionado à inibição da proliferação celular pela BI, previamente observada em estudos de quimioprevenção da hepatocarcinogênese (Cardozo *et al.*, 2011; Espíndola *et al.*, 2005), uma vez que se descreve na literatura que o RAR β é requerido para que retinóides exerçam suas atividades no controle da progressão do ciclo celular (Xu, 2007).

Descreve-se que dentre os receptores para retinóides, o RXR α é um dos mais importantes devido à sua capacidade de regulação de atividades celulares fundamentais, incluindo a proliferação e o metabolismo celular, além de ser considerado o principal regulador de receptores nucleares, por meio da formação de homodímeros ou heterodímeros com outros receptores (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Por meio da análise de *macroarray*, observou-se a expressão hepática do gene que codifica para RXR α aumentada no grupo BI. Por meio de RT-PCR duplex, observou-se que esse aumento ocorreu especificamente nas LPN persistentes do grupo BI, sugerindo que a restauração da função fisiológica do RXR α pode ser uma estratégia efetiva e importante para ação quimiopreventiva da BI.

Levando-se em consideração que o anel ionona, presente na estrutura da BI, está presente também na estrutura molecular do retinol, β -caroteno e do ácido retinóico – substâncias relacionadas à ativação de receptores nucleares e consequente atividade anti-neoplásica em diversos tecidos – aventa-se que a BI possa exercer suas funções quimiopreventivas por meio da ligação aos receptores nucleares RXR e/ou RAR, promovendo

assim a transcrição de genes supressores de tumores, sendo esta ação específica em LPN. No entanto, estudos que avaliem a efetiva ligação da BI a estes receptores nucleares na hepatocarcinogênese são ainda necessários para confirmar tal suposição.

A participação dos receptores nucleares órfãos Nur77 e COUP-TFI na carcinogênese ainda é pouco estudada. As análises realizadas pela plataforma *macroarray* não sugerem alterações na expressão desses receptores na hepatocarcinogênese. No entanto, foi observado por meio de RT-PCR duplex, um aumento na expressão de Nur77 – no *surrounding* e nas LPN em remodelação – e de COUP-TFI – em LPN persistentes e em remodelação, bem como no *surrounding* dessas LPN – nos estágios ainda iniciais da hepatocarcinogênese no modelo do RH.

Relata-se na literatura que Nur77 é encontrado com expressão aumentada no HCC quando causado pelo HBV (Lee *et al.*, 2001). O envolvimento desse receptor na carcinogênese parece estar relacionado a seu papel regulador da proliferação celular e da apoptose, dois importantes processos relacionados à hepatocarcinogênese (Moll *et al.*, 2006). Contudo, apesar das evidências que Nur77 media respostas biológicas de uma variedade de estímulos extracelulares, muito pouco foi elucidado a respeito de genes alvos de Nur77.

COUP-TFI é, dentre os receptores órfãos, um dos mais estudados e COUP-TFI tem sido encontrado com expressão aumentada em diversas linhagens neoplásicas (revisado por Zhou; Tsai; Tsai, 2000). Também conhecido como EAR3, este receptor está envolvido com a regulação de muitos processos biológicos importantes como a neurogênese, organogênese e homeostase metabólica (Park; Tsai; Tsai, 2003). Embora o COUP-TFI tenha sido inicialmente identificado como um fator transcricional do gene da ovoalbumina de galináceos (Pandolfi *et al.*, 1992), este receptor é considerado um repressor da transcrição gênica, por meio da sua heterodimerização com outros receptores nucleares como o RAR, o TR (receptor do hormônio

tireoideano), VDR (receptor da vitamina D) e o HNF4 (fator nuclear 4 de hepatócito) (Weis *et al.*, 1994, Altucci; Gronemeyer, 2001).

As análises realizadas pela plataforma *macroarray* indicam expressão hepática diminuída dos genes que codificam para os receptores órfãos Nur77 e COUP-TFI no grupo tratado com BI. Por meio de RT-PCR duplex, observou-se a expressão hepática diminuída de Nur77 após o tratamento com BI, especificamente em LPN em remodelação, sugerindo uma relação deste gene com o processo de remodelação de LPN induzida pela BI.

Descreve-se que o aumento na expressão de Nur77 pode estar relacionado à inibição da expressão de RAR β , levando a uma resistência ao tratamento com retinóides na carcinogênese (Chen *et al.*, 2002) e conferindo vantagens às células neoplásicas por meio da supressão dos efeitos regulatórios do crescimento dos retinóides (Zhang, 2002). Nesse contexto, aventa-se a possibilidade de que a diminuição da expressão do Nur77 em LPN em remodelação possa estar relacionada ao aumento na expressão do RAR β ocasionado pela BI, o qual promove a supressão da hepatocarcinogênese ou mesmo a indução do processo de remodelação das LPN.

Outro gene encontrado pela análise de *macroarray* com expressão hepática diminuída após o tratamento com BI foi o que codifica para o receptor órfão COUP-TFI. Por meio de RT-PCR duplex, observou-se que o tratamento com BI resultou em diminuição na expressão do mesmo, especificamente em LPN persistentes e em remodelação. Corroborando o observado no presente estudo em animais tratados com BI, descreve-se que a expressão de COUP-TFI tem sido encontrada diminuída quando RXR é super expresso (Cooney *et al.*, 1993). Além disso, sugere-se que COUP-TFI seria capaz de formar heterodímeros com RXR, impossibilitando a resposta supressora de tumor de vários receptores de retinóides (Mangelsdorf; Evans 1995).

Nesse sentido, os dados sugerem que COUP-TFI é um importante alvo da BI na supressão das LPN na hepatocarcinogênese, sendo que esta ação pode estar relacionada ao aumento na expressão de RXR α promovido pela BI.

Considerando-se as ações moleculares de receptores nucleares como elementos do processo da carcinogênese, os dados deste trabalho sugerem que os receptores nucleares de retinóides RAR β e RXR α bem como os receptores órfãos Nur77 e COUP-TFI representam alvos moleculares da BI em LPN, relacionados à quimioprevenção da hepatocarcinogênese (Figura 14).

Figura 14. Alvos moleculares do quimiopreventivo β -ionona na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

6. CONCLUSÕES

- A hepatocarcinogênese desenvolvida em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH parece envolver aumento na expressão dos genes que codificam para os receptores nucleares órfãos Nur77 e COUP-TFI;
- A atividade quimiopreventiva da BI, durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH, parece estar relacionada à alterações na expressão de genes que codificam receptores nucleares, dentre eles, aumento na expressão dos genes que codificam os receptores de retinóides RAR β e RXR α e diminuição na expressão dos genes que codificam os receptores órfãos Nur77 e COUP-TFI;
- A atividade quimiopreventiva da BI, durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH, parece envolver aumento na expressão da proteína RAR β ;
- A ação quimiopreventiva da BI envolve a modulação da expressão gênica de forma específica em LPNs hepáticas;
- A indução do processo de remodelação de LPNs hepáticas pela BI parece envolver alterações na expressão dos genes que codificam os receptores RAR β e Nur77;
- A inibição das LPN persistentes pela BI parece estar relacionada à alterações na expressão dos genes que codificam os receptores RXR α e COUP-TFI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M. *et al.* Cloning of the 5' upstream region of the rat *p16* gene and its role in silencing. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 93, p. 1100-1106, 2002.

ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. The promise of retinoids to fight against cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 1, p. 181-93, 2001.

ANDERSEN, J. B., *et al.* Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat. **Hepatology**, v.51, n.4, p.1401-1409, 2010.

ANDO, N. *et al.* Expression of retinoid X receptor α is decreased in 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene-induced hepatocellular carcinoma in rats. **Oncol Rep**, v. 18, p. 879-84, 2007.

BACH, T. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants- A review. **Lipids**, v. 30, p.191-202, 1995.

BANNASCH, P.; ZERBAN, H. Tumors of the liver. **In: Pathology of Tumors in laboratory Animals**. V. S. Turusov, U. Mohr, Eds. Lyon, IARC Cientific Publications, n.99, v.1, p.199-240, 1990.

BASTIEN, J. *et al.* The phosphorylation site located in the A region of retinoic X receptor α is required for the antiproliferative effect of retinoic acid (RA) and the activation of RA target genes in F9 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 28683-9, 2002.

BASTIEN, J.; ROCHETTE-EGLY, C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. **Gene**, v.328, p. 1-16, 2004.

BENOWITZ, S. Liver Cancer Biomarkers Struggling to Succeed, **JNCI**, v.99, n.8, 590-591, 2007.

BEN-SHUSHAN, E. *et al.* A dynamic balance between ARP-1/COUP-TFII, EAR-3/COUP-TFI, and retinoic acid receptor: retinoid X receptor heterodimers regulate Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells. **Mol. Cell Biol.**, v. 15, p. 1034–1048, 1995.

BODE, A. M.; DONG, Z. Cancer prevention research - then and now. **Nature Rev. Cancer**, v.9, p. 508-516, 2009.

BOSCH, F. X.; RI BES, J.; DIAZ, M.; CLERIES, R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. **Gastroenterology**, v.127, p. S5–S16, 2004.

BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. **Nat. Genet.**, v. 21, p. 33-37, 1999.

BRUIX, J. *et al.* Focus on hepatocellular carcinoma. **Cancer Cell**, v. 5, n. 3, p. 215-219, 2004.

BUHOLZER, C. F. *et al.* Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor is a negative regulator of steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. **Mol Endocrinol.**, v. 19, n. 1, p. 65-75, 2005.

BUHOLZER, C. F. *et al.* Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor is a negative regulator of steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. **Mol. Endocrinol.**, v. 19, n. 1, p. 65-75, 2005.

CARDOZO, M. T., *et al.* Chemopreventive effects of β -ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 130-135, 2011.

CHEN, G. Q. *et al.* Nicotine modulates the effects of retinoids on growth inhibition and RAR beta expression in lung cancer cells. **Int. J. Cancer**, v. 99, p. 171–178, 2002.

CHIARELLO, P. G. *et al.* Effect of a Necrogenic Dose of Diethylnitrosamine on Vitamin E-deficient and Vitamin E-supplemented Rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.929-935, 1998.

COONEY, A. J. *et al.* Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. **J Biol Chem.**, v. 268, p. 4152–4160, 1993.

DHINGRA, S.; BANSAL, M.P. Hypercholesterolemia and tissue-specific differential mRNA expression of type-1 5'-iodothyronine deiodinase under different selenium status in rats. **Biol. Res.**, v. 39, n. 2, p. 307-319, 2006.

EDWARDS, P. A.; ERICSSON, J. Sterols and isoprenoids: Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. **Annu. Ver. Biochem.**, v.68, p.157-185, 1999.

ELSON, C. E. *et al.* Isoprenoid – mediated inhibition of mevalonate synthesis: Potential application to cancer. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.221, p.294-311, 1999.

ELSON, C. E. Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: Protective roles in cancer and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1666s-1672s, 1995.

EMMERT-BUCK, M. R. *et al.* Laser capture microdissection. **Science**, v. 274, n. 5289, p. 998-1001, 1996.

ESPÍNDOLA, R. M. E. *et al.* Geranylgeraniol and β -ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kB activation. **Carcinogenesis**, v.26, n.6, p.1091-1099, 2005.

ESTELLER, M.; ALMOUZNI, G. How epigenetics integrates nuclear functions. Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond. **EMBO**, v.6, p. 624-628, 2005.

FARBER, E. Ethionine carcinogenesis. **Adv Cancer Res.**, v. 7, p. 383–474, 1963.

FARBER, E. Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals. **Cancer Res.**, v. 44, p. 5463-74, 1984.

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

FARBER, E.; Rubin, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. **Cancer Res.**, v. 51, p. 2751-2761, 1991.

FARIA, T. N. *et al.* The targeted disruption of both alleles of RARbeta(2) in F9 cells results in the loss of retinoic acid-associated growth arrest. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 26783–26788, 1999.

FEO, F. *et al.* Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1765, n.2, p.126-147, 2006.

GEISEN, C. *et al.* Growth inhibition of cervical cancer cells by the human retinoic acid receptor gene. **Int. J. Cancer**, v. 85, p. 289–295, 2000.

GLADE, M. J. Food, nutrition, and the prevention of cancer: A global perspective: American Institute for Cancer Res/World Cancer Res Fund, American Institute for Cancer Res. **Nutrition**, v. 15, p. 523–526, 1999.

HARSCH, M. *et al.* A new method for histological microdissection utilizing an ultrasonically oscillating needle demonstrated by differential mRNA expression in human lung carcinoma tissue. **Am. J. Pathol.**, v.158, p.1985-90, 2001.

HE, L. *et al.* Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. **Journal of Nutrition**, v.127, p.668-674, 1997.

HEINDRYCKX, F.; COLLE, I.; VLIERBERGHE, H. V. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. **Int. J. Exp. Path.**, v. 90, p. 367–386, 2009.

HESTER S. D. *et al.*, Normal gene expression in male F344 rat nasal transitional and respiratory epithelium. **Gene**, v. 285, p. 301-310, 2002.

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

HOKAIWADO, N. *et al.* Rapid analysis of gene expression changes caused by liver carcinogens and chemopreventive agents using a newly developed three-dimensional microarray system. **Cancer Sci.**, v. 95, p. 123–130, 2004.

HOLLA, V. R. *et al.* Prostaglandin E2 regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 5, p. 2676-82, 2006.

HSU, H.C.; ZHOU, T.; MOUNTZ, J. D. Nur77 family of nuclear hormone receptors. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 3, n. 4, p. 413-23, 2004.

IMAI, T. *et al.* Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by in situ hybridization. **Carcinogenesis**, v.18, p. 545-551, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2010: Incidência do câncer no Brasil. Disponível em: < www.inca.gov.br > Acesso em: 17 out. 2010.

ITO, N. *et al.* Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats. **Mutat. Res.**, v. 462, p. 209-217, 2000.

ITOH, K. *et al.* Placental steroidogenesis in rats is independent of signaling pathways induced by retinoic acids. **Gen Comp Endocrinol.**, v. 163, n. 3, p. 285-91, 2009.

ITTRICH, C. *et al.* Prevalidation of a rat liver foci bioassay (RLFB) based on results from 1600 rats: A study report. **Toxicol. Pathol.**, v. 31, p. 60-79, 2003

JEONG, J. H. *et al.* Orphan nuclear receptor Nur77 translocates to mitochondria in the early phase of apoptosis induced by synthetic chenodeoxycholic acid derivatives in human stomach cancer cell line SNU-1. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1010, p. 171–177, 2003.

JIANG, Y. H.; BRESSLER, J.; BEAUDET, A.L.; Epigenetics and human disease. **Annu Rev Genomics Hum. Genet.**, v. 5, p. 479-510, 2004.

KAKIZOE, T. Chemoprevention of cancer-focusing on clinical trials. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 33, n. 9, p. 421-42, 2003.

KANAI, Y., *et al.* Aberrant DNA methylation precedes loss of heterozygosity on chromosome 16 in chronic hepatitis and liver cirrhosis. **Cancer Lett.**, v.148, p.73-80, 2000.

KLIEWER, S. A. *et al.* Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**, v. 358, p. 771–4, 1992.

LEE, M. O. *et al.* Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 288, n. 5, 1162-8, 2001.

LIBBRECHT, L.; DESMET, V.; ROSKAMS, T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. **Liver International**, v.25, p.16-27, 2005.

LIM, I. K. Spectrum of molecular changes during hepatocarcinogenesis induced by DEN and other chemicals in Fischer 344 male rats. **Mechanisms of Aging and Development**, v.123, p.1665-1680, 2002.

LIU, J. R., *et al.* Apoptosis of human gastric adenocarcinoma cells induced by b-ionone. **World J. Gastroenterol.**, v.10, n.3, p.348-351, 2004.

LLOVET, J. M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v.3626, p.1907-1917, 2003.

WU, L.; TANG, Z. Y.; LI, Y. Experimental models of hepatocellular carcinoma: developments and evolution. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 135, p. 969–981, 2009.

LUNCH, A. Nature and Nurture – lessons from chemical carcinogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 113-125, 2005.

MADDIKA, S. Cancer-specific toxicity of apoptin is independent of death receptors but involves the loss of mitochondrial membrane potential and the release of mitochondrial cell-death mediators by a Nur77-dependent pathway. **J. Cell. Sci.**, v. 118, 4485–4493, 2005.

MAGGIONI, M. *et al.* Molecular changes in hepatocellular dysplastic nodules on microdissected liver biopsies. **Hepatology**, v.32, p.942-6, 2000.

MANGELSDORF, D. J.; EVANS, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, v. 83, p. 841–850, 1995.

MANGELSDORF, D. J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, p. 835–9, 1995.

MANSON, M. M. *et al.* Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. **Toxicol. Lett.**, v. 112-113, p. 499-505, 2000.

MARTINEZ, G. *et al.* Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 115-127, 2003.

MARTINEZ-GONZALEZ, J.; BADIMON, L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. **Cardiovasc. Res.**, v. 65, p. 609–618, 2005.

MARUYAMA, K. *et al.* Expression of NOR-1 and its closely related members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily in human neuroblastoma cell lines. **Cancer Lett.**, v. 96, p. 117–122, 1995.

MASOTTI, A.; DA SACCO, L.; BOTTAZZO, G. F.; ALISI, A. Microarray technology: a promising tool in nutrigenomics. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 50, n. 7, p. 693-698, 2010.

MO, H.; ELSON, C. E. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids. **Journal of Nutrition**, v.129, p.804-813, 1999.

MOLL, U. M.; MARCHENKO, N.; ZHANG, X. K. p53 and Nur77/TR3 – transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. **Oncogene**, v. 25, p. 4725–4743, 2006.

NEWELL, P. *et al.* Experimental models of hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.**, v. 48, p. 858–879, 2008.

NOWELL, S. A.; AHN, J.; AMBROSONE, C. B. Gene-nutrient interactions in cancer etiology. **Nutrition Reviews**, v.62, n.11, p.427-438, 2004.

OGAWA, K. *et al.* Downregulation of apoptosis revealed by laser microdissection and cDNA microarray analysis of related genes in rat liver preneoplastic lesions. **Med. Mol. Morphol.**, v.38, p.23-29, 2005.

OHLSON, L. C. E.; KORO Xenidou, L.; HALLSTROM, I. P. Inhibition of In Vivo Rat Liver Regeneration by 2-Acetylaminofluorene Affects the Regulation of Cell Cycle-Related Proteins. **Hepatology**, v.27, p.691-696, 1998.

OLIVEIRA, V.N. *et al.* Absence of inhibitory effects of phenylacetate on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. **Int. J. Med. Environ.**, v. 29, p.179-184, 2001.

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**, v. 27, n. 6, p. 1194-1203, 2006.

OSADA, S. *et al.* Altered gene expression of transcriptional regulatory factors in tumor marker-positive cells during chemically induced hepatocarcinogenesis. **Toxicol Lett.**, v. 167, n. 2, p. 106-113, 2006.

PANDOLFI, P. P. *et al.* Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. **Embo J**, v. 11, p. 1397-1407, 1992.

PARK, J. I.; TSAI, S. Y.; TSAI, M. J. Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. **Keio J Med.**, v. 52, n. 3, p. 174–181, 2003.

PARMIGIANI, R. B.; CAMARGO, A. A. O genoma humano e o câncer. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

PEREPECHAEVA, M. L.; SIDOROVA, YU. A.; GRISHANOVA, A. YU. Effect of cold stress on expression of genes for the AhR-dependent pathway of CYP1 regulation in rat liver. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 141, n. 3, p. 287–291, 2006.

PÉREZ-CARREÓN, J. I. *et al.* Gene expression profile related to the progression of preneoplastic nodules toward hepatocellular carcinoma in rats. **Neoplasia**, v.8, n.5, p.373-383, 2006.

PITOT, H. C. *et al.* Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. **Toxicol. Pathol.**, v.24, p.119-28, 1996.

PITOT, H. C. The natural history of neoplastic development: the relation of experimental models to human cancer. **Cancer**, v. 49, n. 6, p. 1206–1211, 1982.

PITOT, H. C. Pathway of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**, v. 358, p. 859-860, 2001.

PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v. 5, p. 2280–2286, 1991.

PRICE, J. M. *et al.* Progressive microscopic alterations in the livers of rats fed the hepatic carcinogens 30 -methyl-4-dimethylaminoazobenzene and 40 - fluoro-4-dimethylaminoazobenzene. **Cancer Res.**, v.12, n. 3, p. 192–200, 1952.

RUTENBURG, A. M. *et al.* Histochemical and ultrastructural demonstration of γ -glutamyl transpeptidase activity. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.17, n.8, 1969.

SACCHETTINI, J. C., POULTER, C. D. Creating isoprenoid diversity. **Science**, v. 277, p. 1788-89, 1997.

SEEWALDT, V. L. *et al.* Expression of retinoic acid receptor beta mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. **Cell Growth Diff.**, v. 6, p. 1077–1088, 1995.

SEGAL, E. *et al.* Decoding global gene expression programs in liver cancer by noninvasive imaging. **Nat Biotechnol.**, v. 25, n. 6, p. 675-80, 2007.

SELL, S. Mouse models to study the interaction of risk factors for human liver cancer. **Cancer Res.**, v. 63, p. 7553–7562, 2003.

SEMPLE-ROBERTS, E. *et al.* Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. **Virchows Arch.**, v.431, p.391-406, 1987.

SCHULTE-HERMANN, R.; TIMMERMAN-TROSIENER, L.; BARTHEL, G.; BURSCH, W. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. **Cancer Res.**, v. 50, p. 5127-5135, 1990.

SOLT, D. T.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p.702-703, 1976.

SONG, Y.S. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **Cancer Lett.**, v. 175, p. 53-61, 2002.

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

STERMER, B. A.; BIANCHINI, G. M.; KORTH, K.L. Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. **J. Lipid. Res.**, v.35, p.1133-40, 1994.

STRONG, K. *et al.* Preventing cancer through tobacco and infection control: How many lives can we save in the next 10 years? **Eur J Cancer Prev**, v. 17, p. 153–161, 2008.

SUN, S.Y. *et al.* Evidence that retinoic acid receptor induction by retinoids is important for tumor cell growth inhibition. **J. Biol. Chem.**, v 275, p. 17149–17153, 2000.

SUZUKI, D. *et al.* Specific differencer in gene expression profile revealed by cDNA microarray analysis of glutathione S-transferase placental form (GST-P) immunohistochemically positive rat liver foci and surrounding tissue. **Carcinogenesis**, v.25, n.3, p.439-443, 2004.

TATMAN, D.; MO, H. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively supress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. **Cancer Letters**, v.175, p.129-139, 2002.

TRAVIS, C. C.; BELEFANT, H. Promotion as a factor in carcinogenesis. **Toxicology Letters**, v.60, p.1-9, 1992.

UEMURA, H.; CHANG, C. Antisense TR3 orphan receptor can increase prostate cancer cell viability with etoposide treatment. **Endocrinology**, v. 139, p. 2329–2334, 1998.

WATSON, W. H.; CAI, J.; JONES, D. P. Diet and apoptosis. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 20, p. 485-505, 2000.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Prev Med.**, v. 25, p. 44-45, 1996.

WEIS, K. *et al.* Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. **Cell.**, v. 76, n. 2, p. 345-56, 1994.

WEISBURGER, J. H. Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future. **Mutat. Res.**, v. 23-35, p. 480–481, 2001.

IARC. **World Cancer Report 2008**. Peter Boyle, P.; Levin, P. IARC Press/Oxford University Press, 2008.

WORM, J; GULDBERG, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. **J. Oral Pathol. Med.**, v.31, p. 443-449, 2002.

WU, Q. *et al.* Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. **EMBO J.**, v. 16, p. 1656–1669, 1997.

WU, Q. *et al.* Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1583–1592, 2002a.

WU, W. S. *et al.* Promyelocytic leukemia protein PML inhibits Nur77-mediated transcription through specific functional interactions. **Oncogene**, v. 21, p. 3925–3933, 2002b.

XU, X. C. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor- β in cancer. **Cancer Letters**, v. 253, p. 14–24, 2007.

YANG-YI, F., *et al.* Chemopreventive n-3 fatty acids activate RXRa in colonocytes. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 9, p.1541-1548, 2003.

YOO, J. S. H.; GUEGERICH, F. P.; YANG, C. S. Metabolism of n-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. **Cancer Research**, v.48, p.1499-1504, 1988.

YOSHIMURA K. *et al.* Phosphorylated retinoid X receptor α loses its heterodimeric activity with retinoic acid receptor β . **Cancer Sci.**, v.98, p. 1868–14, 2007.

YOUNG, M. R.; YANG, H-S.; COLBURN, N. H. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kB and Pdc4. **Trends in Molec. Med.**, v. 9, p. 36-41, 2003.

ZHANG, X. K. Vitamin A and apoptosis in prostate cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 9, n. 2, p. 87-102, 2002.

ZHOU, C.; TSAI, S. Y.; TSAI, M. J. From apoptosis to angiogenesis: new insights into the roles of nuclear orphan receptors, chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors, during development. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1470, p. M63-M68, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1 – Número de acesso, razão da expressão e classificação funcional dos genes com expressão aumentada no tecido hepático de ratos do grupo OM em relação ao grupo N.

Número de acesso (Gene bank)	Nome do gene	Razão OM X N	Classificação funcional
L32591	DNA-damage-inducible transcript 1	2,48	Ciclo celular
X52477	Complement component 3	2,26	Receptores celulares
Y13972	MHC class I-related protein (MR1)	2,32	Proteínas de resposta ao estress
X16956	Beta-2-microglobulin	4,73	Proteínas de tráfego/alvo
D23676	regenerating islet-derived 3 alpha	2,98	Metabolismo
X14878	thioredoxin	7,88	Proteínas de transporte extracelular
M00001	Apolipoprotein A-I	9,26	Não classificado
X03468	Apolipoprotein A-II	6,53	Proteínas de transporte extracelular
M00002	Apolipoprotein A-IV	6,23	Proteínas de transporte extracelular
M27156	probasin	1,97	Proteínas de sinalização celular e comunicação extracelular
D12524	c-kit receptor tyrosine kinase	1,98	Não classificado
J02627	Cytochrome P450, subfamily 2e1 (ethanol-inducible)	2,80	Metabolismo
K01931	Glutathione-S-transferase, alpha type	2,43	Metabolismo
M60753	Catecholamine-O-methyltransferase	2,46	Proteínas de resposta ao estress
D30035	peroxiredoxin 1	5,38	Proteínas de resposta ao estress
X04070	gap junction membrane channel protein beta 1	1,78	Transportadores e canais de membrana
NM_012733	Retinol-binding protein 1	2,02	Transportadores e canais de membrana
X05834	Fibronectin 1	2,49	Não classificado
J02582	Apolipoprotein E,	9,29	Metabolismo
U18650	Huntington disease gene homolog	1,63	Metabolismo
M31788	phosphoglycerate kinase 1	1,50	Metabolismo

D90109	fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2	2,50	Metabolismo
M11251	cytochrome P450 2B1	13,93	Metabolismo
X55446	arachidonic acid epoxigenase	5,23	Metabolismo
M10161	cytochrome P450 3A1 (CYP3A1); P450-PCN1	2,05	Metabolismo
L04970	adenine phosphoribosyltransferase	1,62	Metabolismo
U06273	UDP-glucuronosyltransferase	1,53	Metabolismo
M36708	Arginosuccinate synthetase 1	6,78	Metabolismo
AF038870	betaine-homocysteine methyltransferase	1,83	Metabolismo
J04171	Glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase, cytosolic) see also D1Mgh12	3,03	Metabolismo
J02720	arginase 1, liver	2,24	Metabolismo
K03501	S-mephenytoin 4 hydroxylase; cytochrome P450 IIC9 (CYP2C9) + CYP2C10 + CYP2C17 + CYP2C18 + CYP2C19	1,62	Metabolismo
X15958	Enoyl-CoA hydratase, short chain 1, mitochondrial	1,51	Metabolismo
D16479	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit	2,18	Metabolismo
U22424	Hydroxysteroid dehydrogenase, 11 beta type 2	1,72	Metabolismo
Y17295	peroxiredoxin 5	2,34	Proteínas de modificação pós traducional
X02918	Protein disulfide isomerase (Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide)	1,91	Proteínas de resposta ao estress
M27466	cytochrome oxidase subunit VIc	7,33	Transdução
X68282	Hexokinase 3	3,11	Transdução
K03502	eukaryotic translation elongation factor 2	3,53	proteínas associadas à apoptose
M64723	Clusterin	2,25	Transcrição
X82551	Ribosomal protein L39	7,60	Não classificado
Z29530	acidic ribosomal protein P0	2,02	Proteínas de ligação no DNA e cromatina
D84550	Leptin receptor (fatty)	1,51	Receptores celulares
U62326	macrophage migration inhibitory fator	1,59	Proteínas de sinalização

			celular e comunicação extracelular
M83176	C-reactive protein	2,14	Proteínas de transporte extracelular
M94043	Rab-related GTP-binding protein	3,27	Não classificado
M83676	RAB12, member RAS oncogene family	1,52	Transdutores, efetores e moduladores intracelular
X53363	calreticulin	1,71	Transdutores, efetores e moduladores intracelular
U66478	MAD (mothers against decapentaplegic, Drosophila) homolog 1	1,68	Transcrição
X98517	matrix metalloproteinase 12	5,73	<i>Turnover</i> de proteína
X82396	cathepsin B	1,79	<i>Turnover</i> de proteína
Y00697	Cathepsin L	1,57	<i>Turnover</i> de proteína
AB000491	for proteasomal ATPase (SUG1)	1,80	<i>Turnover</i> de proteína
U12596	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2	1,74	<i>Turnover</i> de proteína
Y11283	inter-alpha-inhibitor H4 heavy chain	2,28	<i>Turnover</i> de proteína
X83231	pre-alpha-inhibitor, heavy chain 3	4,07	Receptores celulares
L31883	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	2,51	Receptores celulares
L31884	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	3,74	Receptores celulares
J00801	whey acidic protein	2,16	Receptores celulares
U10995	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	1,55	Não classificado
M81687	Ryudocan/syndecan 2	4,21	Proteínas de resposta ao estress
S77858	non-muscle myosin alkali light chain	2,09	Síntese, recombinação e reparo do DNA
X96967	profilin	1,88	Não classificado
L77890	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4	1,82	Síntese, recombinação e reparo do DNA
J00750	Metallothionein	2,59	Não classificado
S65838	metallothionein 3	1,58	Não classificado

ANEXO 2 - Número de acesso, razão da expressão e classificação funcional dos genes com expressão diminuída no tecido hepático de ratos do grupo OM em relação ao grupo N.

Número de acesso (Gene bank)	Nome do gene	Razão OM X N	Classificação funcional
L25527	Selectin, endothelial cell	0,49	Proteínas/Receptores de adesão celular
D26112	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	0,44	proteínas associadas à apoptose
AF219904	folate receptor 1	0,49	Metabolismo
L34067	glypican 1	0,46	Receptores celulares
U33553	chondroitin sulfate proteoglycan 5	0,49	Proteínas/Receptores de adesão celular
X64589	Cyclin B1	0,49	Ciclo celular
D26564	CDC37 (cell division cycle 37, S. cerevisiae, homolog)	0,10	Ciclo celular
U05341	cell cycle protein p55CDC	0,45	Proteínas/Receptores de adesão celular
S79794	apoAII=lipoprotein	0,44	Proteínas de transporte extracelular
D38380	Transferrin	0,02	Oncogenes e supressores de tumor
X15705	testis-specific heat shock protein-related gene hst70	0,21	Metabolismo
J05460	Cytochrom P450 (cholesterol hydroxylase 7 alpha)	0,36	Metabolismo
U56853	Cytochrome P450, subfamily XXI (steroid 21-hydroxylase)	0,26	Metabolismo
K01932	Glutathione-S-transferase, alpha type (Ya)	0,26	Proteínas de resposta ao estress
X83581	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16	0,50	Não classificado
AJ001637	Phosphate regulating neutral endopeptidase on the X chromosome (X-linked hypophosphatemia XLH)	0,49	Transportadores e canais de membrana
L19102	solute carrier family 13 (sodium/sulphate symporters), member	0,45	Transportadores e canais de membrana

	1		
M35991	Fatty acid binding protein 1, liver	0,07	Metabolismo
M22642	Thymidine kinase 1	0,49	Metabolismo
U73174	glutathione reductase	0,07	Metabolismo
AF035156	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 3	0,02	Metabolismo
D28773	ThromboxA ane synthase 1	0,14	Metabolismo
L12407	Dopamine beta hydroxylase (dopamine beta-monoxygenase)	0,13	Metabolismo
U11038	Lysyl oxidase	0,04	Transdução
AF003523	bcl-2 associated death agonist	0,39	proteínas associadas à apoptose
D84418	high mobility group box 2	0,50	Receptores celulares
X62875	high mobility group AT-hook 1	0,49	Receptores celulares
AF062594	nucleosome assembly protein 1-like 1	0,50	Receptores celulares
L29232	Insulin-like growth factor 1 receptor	0,48	Receptores celulares
X05137	Nerve growth factor receptor, fast	0,48	Receptores celulares
M95578	Interleukin 1 receptor, type I	0,48	Receptores celulares
L14617	calcitonin receptor	0,45	Receptores celulares
AF176350	cannabinoid receptor 2 gene	0,44	Receptores celulares
U18374	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	0,46	Receptores celulares
L02842	Follicle stimulating hormone receptor	0,43	Receptores celulares
J04811	Growth hormone receptor	0,47	Receptores celulares
AB001982	growth hormone secretagogue receptor	0,39	Receptores celulares
M30705	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2 A	0,48	Transdutores, efetores e moduladores intracelular
S57565	Histamine H2 receptor	0,48	Receptores celulares
D12800	Histamine receptor H1	0,45	Receptores celulares
M29014	Insulin receptor	0,05	Receptores celulares
U34730	Prolactin receptor	0,41	Receptores celulares
Z11504	neuropeptide Y receptor Y1	0,45	Receptores celulares
AF257237	Oxytocin receptor	0,48	Receptores celulares
L19475	parathyroid hormone receptor	0,44	Receptores celulares
U04740	platelet-activating factor receptor	0,37	Receptores celulares
L16922	Progesterone receptor	0,46	Receptores celulares
X62314	Somatostatin receptor subtype 1	0,40	Receptores celulares
M93273	somatostatin receptor subtype 2	0,45	Receptores celulares
X63574	somatostatin receptor 28	0,50	Receptores celulares
L08493	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 4	0,45	Receptores celulares

X57514	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 1	0,46	Receptores celulares
X55183	amphiregulin	0,48	Proteínas de sinalização celular e comunicação extracelular
M55601	Pleiotrophin (Heparine binding factor, Hbnf, in the mouse)	0,43	Proteínas de resposta ao estress
X59949	Nitric oxide synthase 1 (neuronal)	0,37	<i>Turnover</i> de proteína
M11563	Nerve growth factor, gamma polypeptide	0,45	Metabolismo
U03734	Angiotensin I-converting enzyme (Dipeptidyl carboxypeptidase 1)	0,45	<i>Turnover</i> de proteína
M31602	Carboxypeptidase E	0,35	<i>Turnover</i> de proteína
D85509	matrix metalloproteinase 16	0,34	<i>Turnover</i> de proteína
U46034	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	0,14	<i>Turnover</i> de proteína
X12367	Glutathione peroxidase 1	0,11	Transportadores e canais de membrana
AB011365	Peroxisome proliferator activator receptor, gamma	0,45	Não classificado
X56060	Deoxyribonuclease I	0,12	Não classificado
U08290	neuronatin	0,46	Não classificado

ANEXO 3 - Número de acesso, razão da expressão e classificação funcional dos genes com expressão aumentada no tecido hepático de ratos do grupo BI em relação ao grupo OM.

Número de acesso (Gene bank)	Nome do gene	Razão BI X OM	Classificação funcional
U05341	Cell cycle protein p55CDC	1,81	Ciclo celular
J02592	Glutathione-S-transferase, mu type 2 (Yb2)	3,28	Metabolismo
J03752	Microsomal glutathione S-transferase 1	2,51	Proteínas de resposta ao estress
J03867	Diaphorase (NADH) (cytochrome b-5 reductase)	2,95	Metabolismo
J03572	Tissue-nonspecific ALP alkaline Phosphatase	8,26	Metabolismo
X78167	Ribosomal protein L15	1,66	Transdução
X68282	Hexokinase 3	2,45	Transdução
M35077	Dopamine-1A receptor	1,52	Receptores celulares
L10073	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B	1,72	Receptores celulares
AF141863	Melatonin receptor 1B	1,52	Receptores celulares
U47287	Prostaglandin F receptor	1,56	Receptores celulares
U15211	Retinoic acid receptor, alpha	1,64	Receptores celulares
X74832	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle)	1,60	Receptores celulares
X57514	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 1	1,89	Receptores celulares
X56551	Fibroblast growth factor 7	1,56	Proteínas de sinalização celular e comunicação extracelular
Y00697	Cathepsin L	1,57	<i>Turnover</i> de proteína
M27882	Serine protease inhibitor, kanzal type 1/ Trypsin inhibitor-like protein, pancreatic	1,50	<i>Turnover</i> de proteína
X83231	Pre-alpha-inhibitor, heavy chain 3	1,55	<i>Turnover</i> de proteína
X69834	Serine protease inhibitor 2.4	1,55	<i>Turnover</i> de proteína
M91466	Adenosine A2b receptor	1,52	Transportadores e canais de membrana
L06482	Retinoid X receptor alpha	1,87	Receptores celulares
M81766	Retinoic acid receptor, beta	1,78	Receptores celulares

ANEXO 4 - Número de acesso, razão da expressão e classificação funcional dos genes com expressão diminuída no tecido hepático de ratos do grupo BI em relação ao grupo OM.

Número de acesso (Gene bank)	Nome do gene	Razão BI X OM	Classificação funcional
D38380	Transferrin	0,43	Proteínas de transporte extracelular
Y00404	Superoxide dismutase 1, soluble	0,31	Metabolismo
X02904	glutathione S-transferase, pi 1	0,12	Metabolismo
M11251	cytochrome P450 2B1	0,13	Metabolismo
AF257237	Oxytocin receptor	0,37	Receptores celular
D00753	Serine protease inhibitor	0,37	<i>Turnover</i> de proteína
J00696	Orosomucoid 1	0,53	Não classificado
M17698	Thymosin, beta 10	0,42	Não classificado
U10995	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1 (COUP-TFI)	0,11	Receptores celulares
D38530	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (Nur77)	0,33	Receptores celulares

Differential gene expression of hepatic pre-neoplastic lesions of rats treated with the chemopreventive β -ionone (β I): nuclear receptors as molecular targets of bioactive compound foods. 2011.97 f. Thesis (PhD) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2011.

β -ionone (BI) is an isoprenoid which has chemopreventive activity during the promotion phase of hepatocarcinogenesis. This study aimed to evaluate the expression of genes modulated by BI involved in chemoprevention during the promotion phase of hepatocarcinogenesis induced model of "Resistant Hepatocyte" (RH). Male Wistar rats were submitted to the RH model and treated for 4 consecutive weeks with BI (16 mg/100 g bw) or corn oil (CO) (0.25 ml/100 g bw, control group). The expression profile of 1,176 genes was analyzed by macroarray in the liver of groups BI, CO and normal rats (group N). Gene expression was considered increased when the expression ratio was ≥ 1.5 or decreased when ≤ 0.5 . Hierarchical clustering analysis and ontological classification of differentially expressed genes were applied. Gene expression was validated by RT-PCR "duplex", using microdissected hepatic tissue from: persistent pre-neoplastic lesions (pPNL) or remodeling pre-neoplastic lesions (rPNL) and regions around the PNL (surrounding). A total of 133 genes and 32 were considered differentially expressed between the two groups (CO to N) and BI (relative to CO), respectively. 37% of differentially expressed genes in group BI vs CO were related to cell receptors. Of these, four genes encoding for nuclear receptors have been identified as possible targets of BI in the chemoprevention of hepatocarcinogenesis: RXR α (retinoid X receptor α), RARβ (retinoic acid receptor β), COUP-TFI (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I) and Nur77 (nuclear receptor 77). Compared to CO group, the expression of RXRα and RARβ was higher ($p < 0.05$) specifically in pPNL and rPNL of BI group, respectively. Compared to the group N,

Nur77 showed higher ($p < 0.05$) expression in the surrounding and rPNL of CO group. The expression of Nur77 in rPNL was lower ($p < 0.05$) in BI than the CO group. Compared to N group, the expression of COUP-TFI was higher ($p < 0.05$) in CO group (surrounding, pPNL and rPNL). Compared to CO group, the expression of COUP-TFI was lower ($p < 0.05$) in BI group, specifically in the pPNL and rPNL. The results suggest that the nuclear receptors RXR α , RAR α , Nur77 and COUP-TFI represent relevant molecular targets of BI in the chemoprevention of hepatocarcinogenesis in rats.

Keywords: Hepatocarcinogenesis, Chemoprevention, α -ionone, Molecular targets, Nuclear receptors.