UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Efeito da Tributirina na fase de iniciação / promoção inicial da
hepatocarcinogênese, associada ao desenvolvimento da doença
hepática gordurosa não alcoólica em ratos *Wistar*

Roberto Carvalho Yamamoto

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador: Prof. Tit. Dr. Fernando Salvador Moreno – FCF/USP

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Efeito da Tributirina na fase de iniciação / promoção inicial da
hepatocarcinogênese, associada ao desenvolvimento da doença
hepática gordurosa não alcoólica em ratos *Wistar*

Roberto Carvalho Yamamoto

Versão Original

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador: Prof. Tit. Dr. Fernando Salvador Moreno – FCF/USP

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica

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

Y19e	<p>Yamamoto, Roberto Carvalho</p> <p>Efeito da tributirina na fase de iniciação / promoção inicial da hepatocarcinogênese, associada ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica em ratos <i>Wistar</i> / Roberto Carvalho Yamamoto. -- São Paulo, 2017. 84p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Moreno, Fernando Salvador</p> <p>1. Alimentos funcionais : Ciência dos alimentos 2. Carcinoma hepatocelular 3. Fígado gorduroso I. T. II. Moreno, Fernando Salvador, orientador.</p> <p>641.1 CDD</p>
------	--

Roberto Carvalho Yamamoto

**Efeito da Tributirina na fase de iniciação / promoção inicial da
hepatocarcinogênese, associada ao desenvolvimento da doença
hepática gordurosa não alcoólica em ratos *Wistar***

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Dr. Fernando Salvador Moreno
Presidente / Orientador

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2017

Resumo

Yamamoto, R. C. **Efeito da Tributirina na fase de iniciação / promoção inicial da hepatocarcinogênese, associada ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica em ratos *Wistar***. 2017. Xf. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O carcinoma hepatocelular (HCC) é a sexta neoplasia mais comum e a terceira causa de mortalidade por câncer no mundo. Está relacionado, principalmente, à exposição a diversos fatores de risco, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). O HCC apresenta mau prognóstico; neste sentido, é importante a adoção de medidas de controle, como a quimioprevenção. A quimioprevenção é o método mais apropriado para se evitar o câncer e consiste na prevenção, inibição ou reversão das etapas iniciais da carcinogênese, pela administração de um ou mais compostos químicos sintéticos ou naturais. Diversos compostos presentes nos alimentos podem apresentar atividade quimiopreventiva, dentre esses, a tributirina (TB), pró-fármaco do ácido butírico. Dessa forma, propôs-se avaliar o efeito quimiopreventivo da TB nas etapas de iniciação/promoção inicial, em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do hepatócito resistente (RH) associado à NAFLD. Ratos *Wistar* machos foram distribuídos em Grupo dos animais não tratados (NT), e dois outros grupos experimentais, o grupo RH + NAFLD + maltodextrina (grupo controle isocalórico, CI), e o grupo RH + NAFLD + tributirina (grupo TB). Os animais do grupo CI foram tratados diariamente, por gavagem, com emulsão hiperlipídica [1 mL/100 g de peso corpóreo (p. c)], e maltodextrina (300 mg/ 100 g p.c.), enquanto que os animais do Grupo TB foram tratados diariamente, por gavagem, com emulsão hiperlipídica [1 mL/100 g de p. c.], e TB (200 mg/ 100 g de p.c.), durante 13 semanas consecutivas quando foram eutanasiados. Após esse período, a análise por cromatografia a gás revelou que o grupo dos animais tratados com a tributirina apresentou uma concentração de AB 2.118 vezes superior ($p < 0.05$) às concentrações de AB constatadas no grupo controle. Em relação aos dados de morfometria de LPNs [lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN) ou em remodelação (rLPN)], a atividade quimiopreventiva da tributirina foi observada a partir da redução ($p < 0,05$) significativa do número de lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN) em comparação ao grupo controle. A área das pLPNs, contudo, foi maior ($p < 0,05$) no Grupo TB quando comparada à do grupo controle isocalórico. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) no número e na área de rLPN, bem como na % da área do corte do fígado ocupada por LPNs entre os dois grupos experimentais. A quantificação da apoptose por H&E revelou maior ($p < 0,05$) índice apoptótico em pLPN e em rLPN nos animais tratados com TB, quando comparados aos animais do grupo

controle. Nesse sentido, observou-se que os animais tratados com a tributirina apresentaram maior ($p < 0,05$) ativação de Caspase 3 do que os ratos do grupo controle isocalórico. Em relação à avaliação da proliferação celular, o Grupo TB apresentou redução ($p < 0,05$) do índice de proliferação tanto em pLPNs como em rLPNs, quando comparado ao do grupo controle isocalórico. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os *surroundings* dos dois grupos experimentais. A determinação do perfil lipídico sérico revelou que os animais tratados com a tributirina apresentaram menores ($p < 0,05$) concentrações séricas de LDL-colesterol e maiores ($p < 0,05$) concentrações séricas de HDL-colesterol, quando comparados às do grupo controle. Além disso, foram observadas menores ($p < 0,05$) concentrações hepáticas de colesterol no Grupo TB quando comparadas às do Grupo CI. Em relação a análise por PAS, embora, o presente estudo não tenha revelado diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre os dois grupos experimentais, o *score* entre os graus de marcação por PAS apresentou tendência ($p = 0,07$) a ser maior nos animais tratados com a tributirina quando comparados aos ratos do grupo controle. Em relação à expressão gênica de FGF-21, o Grupo TB apresentou maior ($p < 0,05$) expressão em comparação a seu grupo controle (Grupo CI). Além disso, esses dados são corroborados por meio da marcação imunoistoquímica de FGF-21, que revelou que os animais tratados com a tributirina apresentaram maior ($p < 0,05$) *score* desta marcação quando comparados aos ratos do grupo controle isocalórico. A análise de expressão em nível proteico de PPAR- α revelou que o Grupo TB apresentou maior ($p < 0,05$) expressão em comparação ao Grupo CI. O presente estudo demonstrou que o tratamento com a tributirina apresentou um efeito quimiopreventivo quando administrada nas etapas de iniciação/promoção inicial em modelo de hepatocarcinogênese associado à NAFLD. Adicionalmente, sugere-se que a atividade como HDACi da TB poderia modular a expressão de genes supressores de tumor, bem como a daqueles relacionados ao metabolismo lipídico, atenuando os fatores de risco relacionados à NAFLD.

Palavras-chave: quimioprevenção, hepatocarcinogênese, doença hepática gordurosa não alcoólica, tributirina, fator de crescimento de fibroblasto 21, PPAR- α .

Abstract

Yamamoto, R. C. **Effect of Tributirina in the initiation / initial promotion phase of hepatocarcinogenesis associated with the development of non-alcoholic fatty liver disease in *Wistar* rats.** 2017. Xf. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the sixth most common neoplasm and the third leading cause of cancer mortality in the world. It is mainly related to exposure to several risk factors, such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). HCC presents poor prognosis; In this sense, it is important to adopt control measures, such as chemoprevention. Chemoprevention is the most appropriate method to avoid cancer and consists in the prevention, inhibition or reversal of the early stages of carcinogenesis by the administration of one or more synthetic or natural chemical compounds. Several compounds present in foods may present chemopreventive activity, among them, tributyrin (TB), a prodrug of butyric acid. Thus, it was proposed to evaluate the chemopreventive effect of TB in the initiation / initial promotion stages in rats submitted to the hepatocyte-resistant hepatocyte model (HR) associated with NAFLD. Male *Wistar* rats were divided into two groups: RH + NAFLD + maltodextrin (isocaloric control group, CI), and RH + NAFLD + tributyrin group (TB group). The animals of the CI group were treated daily with gavage with hyperlipid emulsion [1 mL / 100 g body weight (wt.)], and maltodextrin (300 mg / 100 g body wt.), while the animals of the TB Group were treated daily by gavage with hyperlipid emulsion [1 mL / 100 g of body wt.], and TB (200 mg / 100 g body wt.) for 13 consecutive weeks when they were euthanized. After this period, the gas chromatographic analysis revealed that the group of animals treated with tributyrin had a concentration of AB 2184 times higher ($p < 0.05$) than the concentrations of AB found in the control group. Regarding the morphometry data of PNLs [persistent pre-neoplastic lesions (pPNL) or remodeling (rPNL)], the chemopreventive activity of tributyrin was observed from a significant ($p < 0.05$) reduction in the number of pPNL compared to the control group. The area of the pPNLs, however, was higher ($p < 0.05$) in the TB Group when compared to the isocaloric control group. There were no statistically significant differences ($p \geq 0.05$) in the number and area of rPNL, as well as in the area of the cut of the liver occupied by LPNs between the two experimental groups. The quantification of apoptosis by H&E revealed a higher ($p < 0.05$) apoptotic index in pPNL and rPNL in the TB treated animals, when compared to the animals in the control group. In this sense, animals treated with tributyrin showed greater ($p < 0.05$) activation of Caspase 3 than the rats of the isocaloric control group. In relation to the evaluation of cell proliferation, the TB group presented a reduction ($p < 0.05$) in the proliferation index in both pPNLs and rPNLs, when compared to the isocaloric control group. No statistically significant difference ($p > 0.05$) was observed between the two experimental groups. The determination of serum lipid profile revealed that the animals treated with tributyrin showed lower ($p < 0.05$) serum LDL-cholesterol concentrations and higher ($p < 0.05$) serum HDL-cholesterol concentrations when compared to those in the group control. In addition, lower hepatic concentrations ($p < 0.05$) of cholesterol were observed in the TB Group when compared to those in the CI Group. Regarding the SBP analysis, although the present study did not reveal a statistically significant difference ($p \geq 0.05$) between the two experimental groups, the score between the PAS presented a tendency ($p = 0.07$) to be greater in animals

treated with tributyrin compared to the rats in the control group. In relation to the gene expression of FGF-21, the TB Group presented higher ($p < 0.05$) expression in comparison to its control group (CI Group). In addition, these data are corroborated by FGF-21 immunohistochemical labeling, which revealed that animals treated with tributyrin showed a higher ($p < 0.05$) score for this marker when compared to the isocaloric control rats. Analysis of protein-level expression of PPAR- α revealed that the TB Group had higher ($p < 0.05$) expression compared to the CI Group. The present study demonstrated that treatment with tributyrin had a chemopreventive effect when administered in the initiation / initial promotion steps in a hepatocarcinogenesis model associated with NAFLD. In addition, it is suggested that the activity as HDACi of TB could modulate the expression of tumor suppressor genes, as well as those related to lipid metabolism, attenuating the risk factors related to NAFLD.

Key words: chemoprevention, hepatocarcinogenesis, non-alcoholic fatty liver disease, tributyrin, fibroblast growth factor 21, PPAR- α .

Dedico esta tese e agradeço

a Deus pela oportunidade de poder conhecer um pouquinho mais da mecânica de seus segredos

à minha família pelo apoio dado em diversos momentos da minha vida. À Aurea, Roberto, Fernanda, Laura, Priscila, Nelson e César. Obrigado pelos pensamentos positivos, compreensão e todo o apoio que me deram nessa jornada.

aos meus avós Tatamu, Matsui, João (*in memorian*) e Yolanda (*in memorian*).

Aos meus tios, Carmen, Éden, Denise, Reinaldo, Carlos, Patrícia, Rodolfo, Eiko, Kimiyoshi, Alberto, Marluce.

ao meu orientador, professor Fernando Salvador Moreno. Muito obrigado pela confiança, ensinamentos e paciência, que só me fez crescer e amadurecer nesta área tão desafiadora, a área do conhecimento.

em especial, a Lá, que me fez compreender o que é o amor, em sua mais simples forma, pôde transformar e bagunçar a minha vida.

Du hast die schönsten Augen

Mädchen, was willst du mehr?

(Dostoiévski)

Every minute from this minute now

We can do what we like anywhere

I want so much to open your eyes

'Cause I need you to look into mine

(Snow Patrol)

Meus agradecimentos ainda

aos meus caros amigos e colegas de laboratório Laura, Ernesto, Paulo Eduardo, Danieli, Ana Paula, Juliana, Mayara e Aline, muito obrigado pelo apoio, pelas conversas científicas e as que eram “quase” científicas;

aos meus caros amigos e colegas de departamento Guto, Eric, Luciana, Illana, Marina, Mariana, Lívia Ribeiro, Lívia Chassot, Camille, Luiza, Gabi, Victor, Samira, Grazi, Bruna, muito obrigado pelas experiências, risadas e cafés;

à querida Dra. Kelly Furtado, pelo incentivo, orientações e todo o carinho que me fez enxergar o mundo da pesquisa da mesma forma que uma criança fica maravilhada ao entrar em um parque de diversões;

à Professora Titular Dra. Maria Lúcia Zaidan e ao Professor Dr. Bruno Cogliati da FMVZ/USP, por terem facilitado as dependências e equipamentos de seus laboratórios, bem como a cordialidade, solicitude e paciência em todos os momentos;

ao Professor Dr. Luís Fernando Barbisan pela ajuda nas marcações imunoistoquímicas e nas discussões científicas, sendo sempre solícito e cordial;

ao professor Dr. Eduardo Purgatto pela ajuda na análise de quantificação de ácido butírico.

aos queridos amigos Cléo, Mônica, Edilson, Roberta, Lurdinha e Rose pelas risadas, brincadeiras, broncas, além da gentileza e dedicação com meus pedidos às vezes “inoportunos”;

aos técnicos de laboratório Renato, Alexandre, Tatiane, Aline, Laila, Elias, Fabiana e em especial a minha querida amiga Ivanir, pela paciência, solicitude e pelo prazer que tem em deixar o desafio da pesquisa um pouco mais leve;

aos funcionários do biotério pelo suporte, carinho e cuidado despendido com os animais

ao SR. João e a equipe de manutenção da FCF-USP, pela cordialidade e solicitude;

à CNPq, CAPES e FAPESP, pelas bolsas e auxílios sem os quais não teria sido possível concretizar essa investigação.

“Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações (...). Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos”.

Albert Einstein

Sumário

1. Introdução.....	22
2. Objetivo geral.....	28
3. Material e métodos	29
3.1 Animais	29
3.2 Indução de NAFLD	29
3.3 Modelo do “Hepatócito Resistente”	30
3.4. Protocolo experimental.....	30
3.5 Eutanásia dos animais e coleta das amostras	31
3.6 Exame macroscópico dos fígados	32
3.7 Quantificação da apoptose por coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E)	32
3.8. Identificação de glicogênio hepático por coloração com Ácido Periódico-Schiff (PAS)	33
3.8.1 Avaliação qualitativa da coloração para PAS.....	34
3.9 Marcação imunoistoquímica	35
3.9.1 Marcação imunoistoquímica para glutathione S-transferase em sua forma placentária (GST-P)	35
3.9.1.1 Identificação e quantificação de LPN GST-P positivas	35
.....	36
3.9.2 Dupla marcação imunoistoquímica para <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> (PCNA)	36
.....	36
3.9.2.1 Avaliação e quantificação da proliferação celular	37
3.9.3 Marcação imunoistoquímica para <i>Fibroblast growth factor</i> 21 (FGF-21).....	38
3.9.3.1 Avaliação qualitativa da marcação imunoistoquímica para FGF-21	38
3.10 Determinação da concentração de AB	39
3.11 Determinação da concentração de dialdeído malônico (MDA) no fígado.....	40
3.12 Determinação sérica do perfil lipídico e das enzimas hepáticas ALT e AST	41
3.13 Determinação hepática de colesterol total e triacilgliceróis	41
3.14 Extração de proteína total	41
3.15 Extração ácida de histonas.....	41
3.16 Western blot para Caspase 3, H3K9 acetilada e PPAR- α	42
3.17 Avaliação da expressão gênica de FGF-21	43
3.18 Análise estatística dos dados	43
4. Resultados.....	44
4.1 Curva ponderal e consumo de ração.....	44

4.2 Pesos corpóreos iniciais e finais, hepáticos absolutos e relativos dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.....	46
4.3 Macroscopia.....	46
4.4 Determinação da concentração hepática de AB dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.....	47
4.5 Análise morfológica de LPNs GST-P positivas dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.....	48
4.6 Quantificação da apoptose por coloração de H&E dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.....	50
4.7 Western blot para Caspase 3 clivada	50
4.8 Análise da proliferação celular dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.....	51
4.9 Determinação das enzimas hepáticas séricas ALT e AST, dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.....	52
4.9 Determinação do perfil lipídico sérico dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.....	53
4.10 Determinação das concentrações hepáticas de colesterol total e triacilgliceróis dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD	53
4.11 Concentração de MDA em homogenato de tecido hepático dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD	54
4.12 Avaliação qualitativa da coloração para PAS dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD	55
4.13 Western blot para histona H3K9 acetilada.....	56
4.14 Expressão gênica de FGF-21 dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.....	57
4.15 Avaliação qualitativa da marcação imunoistoquímica para FGF-21 dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.....	57
4.12 Western blot para PPAR- α	59
5. Discussão.....	60
6. Conclusão.....	68
7. Referências.....	69
8. Anexo	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Delineamento Experimental.	31
Figura 2	<p>Fotomacrografias representativas do fígado de ratos <i>Wistar</i> NT (2A), Grupo CI (2B) e Grupo TB (2C). A seta indica a presença de nódulo pré-neoplásico na fase de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.</p> <p>Além disso, pode ser observada coloração mais amarelada típica da presença de gordura, sendo que no grupo CI (2B), esta se apresenta mais proeminente do que no Grupo TB (2C).</p>	32
Figura 3	<p>Fotomicrografia representativa de corpúsculo apoptótico (seta) observado em corte histológico de fígado corado com H&E. Objetiva de 40X.</p>	33
Figura 4	<p>Fotomicrografia representativa de corte histológico de fígado marcado por coloração com PAS. A coloração possibilitou a observação de quatro intensidades de marcação, sendo portanto, classificados em quatro graus: Grau I: Marcação de intensidade fraca (Figura 4A), Grau II: Marcação de intensidade moderada (Figura 4B), Grau III: Marcação de intensidade forte (Figura 4C) e Grau IV: Marcação de intensidade muito forte (Figura 4D). Objetiva de 10X.</p>	34
Figura 5	<p>Fotomicrografia representativa de corte histológico de fígado marcado com GST-P, A imunomarcação pela GST-P permite a distinção de lesões pré-neoplásicas persistentes (6A - bordas definidas e marcação uniforme), e em remodelação (6B - bordas irregulares e marcação não-uniforme no interior do foco). Objetiva de 20X.</p>	36

Figura 6	<p>Fotomicrografia representativa de corte histológico de fígado marcado para PCNA e GST-P. A dupla marcação imunoistoquímica para PCNA (marrom) e GST-P (rosa) permite a observação de núcleos positivos para PCNA em fase S (fortemente corados), especificamente no surrounding, e em LPN, persistentes (6A) e em remodelação (6B). As setas indicam os núcleos fortemente corados que exibem a marcação para PCNA. Objetiva de 20X.</p>	37
Figura 7	<p>Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado marcados com FGF-21. A marcação imunoistoquímica para FGF-21 possibilitou a observação de três intensidades de marcação, sendo portanto, classificados em três tipos de graus: Grau I: Ausência ou marcação de intensidade fraca (7A). Grau II: Marcação de intensidade moderada (7B). Grau III: Marcação de intensidade forte (7C). Objetiva de 20X.</p>	39
Figura 8	<p>Evolução de peso corpóreo dos animais submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD, grupo CI (n = 13), e grupo TB (n = 10); DEN = dietilnitrosamina; 2-AAF = 2-acetilaminofluoreno.</p>	44
Figura 9	<p>Evolução do consumo de ração dos animais submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD, grupo CI (n = 13), e grupo TB (n = 10); DEN = dietilnitrosamina; 2-AAF = 2-acetilaminofluoreno.</p>	45

Figura 10	Fotomicrografias representativas do fígado de ratos Wistar NT (10A), e dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD. As setas indicam a presença de nódulos pré-neoplásicos na fase de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese. Além disso, pode ser observada a coloração amarelada menos proeminente no grupo TB (10C), quando comparada ao Grupo CI (10B).	47
Figura 11	Concentração hepática de ácido butírico (AB) dos animais do Grupo TB (n = 5) e do Grupo CI (n = 7) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.	47
Figura 12	Quantificação do índice apoptótico (%) do fígado dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.	50
Figura 13	Expressão em nível proteico de caspase 3 clivada dos animais do Grupo TB (n = 6) e do Grupo CI (n = 6) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.	51
Figura 14	Quantificação do índice de proliferação celular (%) do fígado dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.	52
Figura 15	Concentrações hepáticas de MDA/μg de proteínas dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.	54

Figura 16	<p>Fotomicrografia representativa de corte histológico de fígado marcado por coloração com PAS. A coloração possibilitou a observação de quatro intensidades de marcação, sendo portanto, classificados em quatro graus: Grau I: Marcação de intensidade fraca (Figura 16A), Grau II: Marcação de intensidade moderada (Figura 16B), Grau III: Marcação de intensidade forte (Figura 16C) e Grau IV: Marcação de intensidade muito forte (Figura 16D). Objetiva de 10X.</p>	55
Figura 18	<p>Expressão gênica de FGF-21 dos animais do Grupo TB (n = 4) e do Grupo CI (n = 4) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.</p>	57
Figura 19	<p>Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD, marcados com FGF-21. A marcação imunoistoquímica para FGF-21 possibilitou a observação de três intensidades de marcação sendo, portanto, classificados em três tipos de graus: Grau I: Ausência ou marcação de intensidade fraca (20A). Grau II: Marcação de intensidade moderada (20B). Grau III: Marcação de intensidade forte (20C). Objetiva de 20X.</p>	58
Figura 20	<p>Expressão em nível proteico de PPAR-α dos animais do Grupo TB (n = 7) e do Grupo CI (n = 7) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.</p>	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Composição nutricional da emulsão hiperlipídica	29
-----------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pesos corpóreos iniciais e finais, hepático absoluto e relativo dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.	46
Tabela 2	Análise morfométrica pela marcação com GST-P do fígado dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.	49
Tabela 3	Determinação das enzimas hepáticas séricas ALT e AST, dos animais do Grupo TB (n = 9) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.	52
Tabela 4	Análise dos parâmetros de perfil lipídico sérico: Colesterol Total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e Triacilgliceróis dos animais do Grupo TB (n = 9) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.	53
Tabela 5	Determinação das concentrações hepáticas de Colesterol Total e Triacilgliceróis dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.	54
Tabela 6	Avaliação qualitativa da coloração para PAS dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.	56
Tabela 7	A análise de expressão em nível proteico de PPAR- α revelou que o Grupo TB apresentou maior (p < 0,05) expressão em comparação ao Grupo CI.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AAF	2-acetilaminofluoreno
AB	Ácido butírico
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	Proteína quinase ativada por 5' adenosina monofosfato
AST	Aspartato aminotransferase
BSA 1%	Albumina sérica bovina
CI	Controle isocalórico
CPT1a	Carnitina palmitoiltransferase 1a
DEN	Dietilnitrosamina
FAS	Ácido graxo sintase
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GST-P	Glutathione S-transferase em sua forma placentária
H&E	Hematoxilina e eosina
HAT	Acetilase de histonas
HBV	Vírus da hepatite B
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCV	Vírus da hepatite C
HDAC	Desacetilase de histonas
HDACi	Inibidor de desacetilases de histonas
HDL-colesterol	Lipoproteína de alta densidade
HMGCS2	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-sintase
HP	Hepatectomia parcial
IL	Interleucina
LDL-colesterol	Lipoproteína de baixa densidade
LPN	Lesões pré-neoplásicas
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
NF- κ B	Fator nuclear-kappaB
NT	Não tratado
p.c.	Peso corpóreo
pLPN	Lesões pré-neoplásicas persistentes
PPAR- α	Receptores α ativados por proliferador de peroxissomo
RH	Hepatócito resistente
rLPN	Lesões pré-neoplásicas em remodelação
RXR	Receptores retinóides X
SREBP-1C	Proteínas 1C ligadora do elemento regulatório de esterol
TB	Tributirina
TNF- α	Fator α de necrose tumoral

1. Introdução

O carcinoma hepatocelular (HCC) é a sexta neoplasia mais comum e a terceira em mortalidade no mundo (SINGH et al., 2013). Em países ocidentais a incidência do HCC está aumentando em comparação aos outros tipos de cânceres, e atinge principalmente homens entre 40 e 60 anos de idade (BLONSKI, KOTLYAR, FORDE, 2010). Isso está relacionado, principalmente, ao consumo excessivo de bebidas alcoólicas, uso de tabaco, exposição a carcinógenos e pela doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). Além disso, as infecções pelos vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV), e o consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas, também são importantes agentes etiológicos do HCC (SINGH et al., 2013).

A hepatocarcinogênese ocorre em múltiplas etapas (FARBER, RUBIN, 1991), mas que podem ser basicamente classificadas em iniciação, promoção e progressão (PITOT, 2001). A iniciação pode ser originada por carcinógenos genotóxicos que provocam danos irreversíveis no DNA, seguida da falha na correção dos danos gerados. A etapa de promoção é caracterizada por uma fase reversível e definida pela expansão clonal de hepatócitos iniciados (hepatócitos alterados), por meio da proliferação celular, que pode levar à formação de focos de hepatócitos alterados fenotipicamente, conhecidos como lesões pré-neoplásicas (LPN). Na última etapa, a progressão, as LPN podem, eventualmente, progredir para o câncer (FEO et al., 2006).

Dentre os diversos protocolos de hepatocarcinogênese, o modelo do “hepatócito resistente” (RH), descrito por SOLT e FARBER (1976), é adequado para induzir a incidência de LPN, bem como para avaliar e comparar os efeitos de substâncias quimiopreventivas capazes de modular o processo carcinogênico (FARBER, SARMA, 1987).

O modelo baseia-se na administração única de dietilnitrosamina (DEN), um carcinógeno completo e indireto, com maior potencial iniciador do que promotor, necessitando da bioativação hepática que, quando α -hidroxilado, forma compostos eletrofílicos reativos que reagem com as bases de DNA formando adutos, seguida da administração de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), outro carcinógeno completo e indireto, porém com maior potencial promotor, capaz de inibir a proliferação da maioria dos hepatócitos normais, mas não a dos hepatócitos iniciados pela DEN. Após duas semanas, da administração de 2-AAF é realizado um estímulo mitogênico, representado pela hepatectomia parcial (HP) à 70%, seguido ainda por quatro doses consecutivas de 2-AAF. Ao final de oito semanas os animais são eutanasiados e é possível a visualização de nódulos macroscópicos (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; DE CONTI et al., 2012; GUARIENTO et al., 2014).

Uma das características do modelo do RH é sua propriedade de distinguir lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), consideradas sítios de progressão para o HCC, das lesões pré-neoplásicas que sofrem remodelação (rLPN) para um aspecto “normal” do fígado (RIZZI et al., 1997). Aproximadamente 95% das LPN sofrem remodelação, enquanto que 5% têm características de pLPN com tendência de evolução para o HCC (FARBER, RUBIN, 1991).

O HCC apresenta mau prognóstico, e apenas 5% dos pacientes sobrevivem por mais de cinco anos (BLONSKI, KOTLYAR, FORDE, 2010). Desta forma, tornam-se importantes medidas de controle do HCC, como a quimioprevenção, definida por SPORN (1976), como a utilização de compostos naturais ou sintéticos para prevenir, reverter ou inibir os múltiplos estágios da carcinogênese. Nesse sentido, estudos experimentais e epidemiológicos já relacionaram o consumo de compostos bioativos presentes em alimentos como frutas e hortaliças, à prevenção de diversos tipos de neoplasias (ONG et al., 2012; SURH, 2003), inclusive o HCC (SINGH et al., 2013).

O ácido butírico (AB) é um ácido graxo de cadeia curta, produto da fermentação de fibras alimentares pela microbiota gastrointestinal (WATKINS et al., 1999; DONOHOE et al., 2012), e da digestão de dibutilglicerol e tributilglicerol, presentes na gordura do leite bovino (LAI et al., 1997; PARODI, 1997) e, em menor quantidade, no mel (NOZAL et al., 2003). É responsável pelo fornecimento de 70 a 90% da energia consumida pelo colonócito (SCHEPPACH et al., 1992), além de favorecer a manutenção fisiológica do cólon (WATKINS et al., 1999).

Em estudos anteriores, o AB apresentou papel antiinflamatório, principalmente pela inibição do fator nuclear-kappaB (NF- κ B). O NF- κ B está frequentemente alterado no câncer de cólon e em doenças inflamatórias do intestino, tais como a colite ulcerosa (ROGLER et al., 1998; CANANI et al., 2011) e a doença de Crohn, além de ser responsável pela regulação de citocinas pró-inflamatórias como o fator α de necrose tumoral (TNF- α) (SEGAIN et al., 2000; DI SABATINO et al., 2007) e as interleucinas (IL)-2, IL-6, IL-8, IL-12 (SEGAIN et al., 2000).

Além disso, em estudos *in vivo*, observou-se que a suplementação de rações com AB parece induzir a ativação da proteína quinase ativada por 5' adenosina monofosfato (AMPK), aumentando o gasto energético e reduzindo a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica (GAO, et al 2009). A via AMPK apresenta papel regulatório no metabolismo energético, por meio dos seus efeitos sobre o metabolismo lipídico e da glicose (LONG, ZIERATH, 2006), promovendo a β -oxidação dos ácidos graxos, além de suprimir a expressão da síntese de ácidos graxos, por meio das proteínas 1C ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP-1C) (XU et al, 2012; ENDO et al, 2013).

O AB vem sendo considerado um potencial agente quimiopreventivo para o câncer. Contudo, seu mecanismo não está completamente elucidado. Sugere-se que este ácido graxo reduz o tempo de trânsito das fezes no intestino, diminuindo a exposição do cólon à agentes carcinogênicos (CANANI et al, 2011). Além disso, os efeitos do AB podem ser observados *in vitro*, em linhagens celulares, como de câncer de mama (WALKER et al., 2001; ANDRADE et al, 2009), estômago (LITVAK et al., 2000), próstata (KUEFER et al., 2004) e HCC (WATKINS et al., 1999), em que os principais mecanismos envolvidos parecem modular a proliferação, diferenciação celular e apoptose (CANANI et al, 2011). Nesse sentido, sugere-se que estes mecanismos parecem ser modulados por processos epigenéticos, como a acetilação de histonas (RIGGS et al, 1977; BOFFA et al., 1978).

A acetilação neutraliza a carga positiva dos resíduos de lisina, diminuindo a afinidade das histonas pela carga negativa do DNA. Esse evento permite o desprendimento da terminação da histona do nucleossomo, afrouxando a estrutura da cromatina, favorecendo o acesso de fatores de transcrição (DRUESNE et al., 2004). O processo de regulação do estado de acetilação se dá por meio de enzimas acetilases (HAT) e desacetilases de histonas (HDAC) desempenhando, respectivamente, ações promotoras e supressoras da expressão gênica (SANTOS-ROSA, CALDAS, 2005).

O AB age como um inibidor de desacetilase de histonas (HDACI), principalmente na histona H3 no resíduo de lisina 9 (H3K9), promovendo a hiperacetilação de histonas, modulando a transcrição de vários *genes* (SHIN et al., 2012), como por exemplo, o aumento da expressão de *genes* supressores de tumor. Nesse sentido, o AB aumenta a expressão de p21^{cip/waf}, um gene supressor de tumor que influencia diversos processos funcionais da célula, como a divisão, apoptose, reparo e diferenciação (DRUMMOND et al., 2005).

Contudo, a utilização do AB *in vivo* é limitada devido à sua meia-vida reduzida, de aproximadamente 5 minutos em roedores. Em seres humanos, a meia-vida do AB pode atingir 14 minutos quando ligado à proteínas plasmáticas, o que inviabiliza a administração de AB por via oral. No caso da via parenteral é necessário grande volume para se alcançar concentrações farmacológicas efetivas (DANIEL et al., 1989). Dessa forma, a tributirina (TB), pró-fármaco do AB, apresenta propriedades farmacocinéticas favoráveis para administração *in vivo*, quando comparada ao AB (EDELMAN et al., 2003).

A TB é um triacilglicerol constituído por três moléculas de AB esterificado ao glicerol. A hidrólise completa de 1 mol de TB por lipases fornece 2 mol de butirato (AB ligado a uma molécula de sódio) e 1 mol de 2-monobutirilglicerol. A meia-vida do AB, após a administração por via oral de TB, em roedores é aumentada para 40 minutos (SU

et al., 2006). Além disso, a administração de TB em roedores, por via parenteral ou oral, não apresentou efeitos tóxicos (EGORIN et al., 1999).

A TB apresentou ação quimiopreventiva *in vitro* (CHEN, BREITMAN, 1994; WATKINS et al., 1999; MAIER et al., 2000; CLARKE et al., 2001; SCHRÖDER, MAURER, 2002) e, *in vivo* (KUEFER et al., 2004; KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012; GUARIENTO et al., 2014; HEIDOR et al., 2014). Estudos prévios em nosso laboratório, observaram *in vivo*, que a TB apresentou atividade quimiopreventiva quando administrada durante as fases de iniciação e promoção (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; GUARIENTO et al., 2014), bem como, somente durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese (DE CONTI et al., 2012). Entre os mecanismos da TB, destacam-se a indução da apoptose, diferenciação celular e a modulação de mecanismos epigenéticos (HEIDOR et al., 2012).

A indução de apoptose consiste em um mecanismo importante na quimioprevenção da hepatocarcinogênese. Os efeitos pró-apoptóticos da TB são consideráveis em linhagem de câncer de próstata, quando comparada à administração em concentração equimolar de AB (KUEFER et al., 2004), bem como em estudos *in vivo* (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012). Além disso, este efeito é específico em células pré-neoplásicas ou neoplásicas e não afeta as células consideradas “normais” (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012).

Outro mecanismo importante, é a indução da diferenciação celular. Em estudos *in vitro*, o AB demonstrou ser um potente diferenciador em linhagens K-562 e HL-60 de leucemia, PANC1 de carcinoma de pâncreas, (WITT et al., 2001; DAVIE, 2003), HT-29 de cólon (GASCHOTT, 2001, WITT et al., 2001). Por outro lado, o tratamento *in vitro* com TB, demonstrou ser 3 vezes mais potente do que o AB, em linhagens HL-60 e MEL (CHEN, BREITMAN, 1994). Contudo, os mecanismos destes compostos na indução da diferenciação celular não estão elucidados (HEIDOR et al., 2012).

Além disso, a TB pode modular mecanismos epigenéticos, como a acetilação de histonas (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009). A TB age como HDACi, principalmente H3K9, assim como o AB, promovendo a hiperacetilação de histonas, modulando a transcrição de vários genes, como por exemplo, o aumento da expressão do gene p21^{cip/waf} (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; DE CONTI et al., 2012).

Em modelos *in vivo*, observou-se também que a TB promove o aumento do gasto energético, com consequente redução do peso corpóreo (p.c.) e, redução da resistência insulínica, mesmo na presença de dieta hipercalórica (VINOLO et al., 2012). Ainda, tanto a TB como o AB, parecem atenuar parâmetros pró-inflamatórios, como por exemplo TNF- α e IL-6 (VINOLO et al., 2012), bem como reduzir os níveis de colesterol (ALVARO et al.,

2008). Dessa forma, sugere-se que TB poderia inibir o desenvolvimento da NAFLD, por atuar em alguns dos seus fatores de risco (VINOLO et al., 2012).

A NAFLD é considerada uma das doenças mais comuns nos Estados Unidos, e possivelmente em todo o mundo (MICHELOTTI, MACHADO, DIEHL, 2013); atingindo proporções epidêmicas (LOOMBA, SANYAL, 2013). Esta doença compreende desde a esteatose hepática, definida pela infiltração de ácidos graxos em mais de 5% dos hepatócitos, à esteato-hepatite não alcoólica (NASH), caracterizada pela presença de esteatose hepática, inflamação e degeneração lobular, com ou sem a presença de fibrose peri-sinusoidal e cirrose, na ausência da ingestão excessiva de etanol (menos de 20 g de etanol por dia para mulheres e menos de 30 g por dia para homens) (ANSTEE, DAY, 2013; LOOMBA, SANYAL, 2013).

Embora os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da NAFLD sejam desconhecidos, uma das principais hipóteses é a de “dois insultos” (DAY, JAMES, 1998), modificada posteriormente para “múltiplos insultos” (TILG, MOSCHEN, 2010). O primeiro insulto se caracteriza por resistência à insulina que favorece a retenção de triacilgliceróis no interior dos hepatócitos (DAY, JAMES, 1998; TAKAKI, KAWAI, YAMAMOTO, 2013). O segundo insulto pode ser considerado um conjunto de processos como estresse oxidativo, peroxidação de ácidos graxos livres, produção de citocinas pró-inflamatórias, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipoadiponectinemia e apoptose (HEBBARD, GEORGE, 2011). Além disso, outros insultos podem ser observados, como estresse do retículo endoplasmático, estado inflamatório crônico e disfunção mitocondrial (TILG; MOSCHEN, 2010). Deste modo, faz-se necessário a utilização de modelos experimentais em animais que possam refletir, de forma sólida e reprodutiva, a histopatologia e fisiopatologia da doença, permitindo maior compreensão destes mecanismos (HEBBARD, GEORGE, 2011; KANURI, BERGHEIM, 2013).

Dentre os diversos modelos experimentais de desenvolvimento da NAFLD (HEBBARD, GEORGE, 2011), destaca-se o de ZOU et al. (2006). Neste modelo, observou-se em ratos machos da linhagem *Sprague-Dawley* que uma dieta hiperlipídica (71% de calorias provenientes de gordura, 11% de carboidratos e 18% de proteínas), pode resultar em alterações hormonais, bioquímicas e pró-inflamatórias, correspondendo àquelas observadas em indivíduos diagnosticados com NAFLD (ZOU et al., 2006; HEBBARD, GEORGE, 2011) como resistência insulínica, aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e aumento nas concentrações séricas de colesterol total e triacilgliceróis (ZOU et al., 2006; ANSTEE, DAY, 2013).

A alteração do metabolismo de ácidos graxos poderia estar associada ao perfil lipídico observado em pacientes com NAFLD (LIU et al., 2015). Um dos fatores

relevantes na metabolização destes ácidos graxos é o fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF-21) (XU et al., 2009; LI et al., 2012; YANG et al., 2013).

O FGF-21 é membro de uma subfamília dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), que também inclui o FGF-15, FGF-19 e FGF-23 (NYGAARD et al., 2014). FGF-21 promove a β -oxidação de ácidos graxos, cetogênese, e a gliconeogênese, em resposta a diversos tipos de estresses metabólicos (LI et al., 2012; BAE, KIM, PARK, 2014). Os FGFs ligam-se a receptores de FGF (FGFR) na superfície de membrana das células e precisa de sulfato de heparina para estabilizar a ligação. Contudo, o FGF-21 necessita da formação de um complexo para estabilizar essa ligação, com FGFR e uma proteína transmembrana, a β -Klotho, expressa principalmente no fígado, tecido adiposo e pâncreas (BAE, KIM, PARK, 2014).

No fígado, a expressão do gene que codifica para o FGF-21 é regulada pelos receptores α ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR- α) e os receptores retinóides X (RXR), na região promotora do gene (BADMAN et al., 2007; INAGAKI et al., 2007) ou ainda, por agonistas de PPAR- α (IGLESIAS et al., 2012). Além disso, sugere-se que mecanismos epigenéticos modulam a expressão de FGF-21. Observou-se em modelo *in vivo*, que a administração de HDACi, como a tricostatina e o butirato de sódio, aumentam a expressão de FGF-21, com possível aumento da acetilação da região promotora desse gene (LI et al., 2012; TIAN et al., 2013).

Sugere-se que a metabolização dos ácidos graxos, por meio da ação do FGF-21, envolva proteínas como carnitina palmitoiltransferase 1a (CPT1a) (CUEVAS-RAMOS et al., 2009; DASARATHY et al., 2011) e da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-sintase 2 (HMGCS2) (CUEVAS-RAMOS et al., 2009). Nesse sentido, também pode ser observado a indução de vias de sinalização, como a AMPK (LIU et al., 2015). Além disso, o FGF-21, inibe a síntese de ácidos graxos, por meio da SREBP-1C e a enzima ácido graxo sintase (FAS) (ZHANG et al., 2011; LIU et al., 2015).

Em estudos *in vivo*, o tratamento com FGF-21 resultou no aumento significativo dos níveis séricos das lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol), adiponectina e, reduziu os níveis de leptina, de marcadores inflamatórios e, de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol), sugerindo, uma possível melhora nos impactos da NAFLD (NYGAARD et al., 2014).

Como exposto, a TB parece atuar na apoptose, e em mecanismos epigenéticos modulando o desenvolvimento de HCC, bem como no metabolismo lipídico por meio do aumento da expressão de FGF-21, que poderia, eventualmente, amenizar os múltiplos impactos observados na NAFLD. Assim, aventa-se que a TB poderia apresentar ações quimiopreventivas em LPN hepáticas potencializadas pelo desenvolvimento de NAFLD.

2. Objetivo geral

Avaliar o efeito quimiopreventivo da TB nas etapas de iniciação/promoção inicial, em ratos *Wistar* submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do hepatócito resistente associado à NAFLD.

3. Material e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*, com pesos iniciais compreendidos entre 70 e 90 g obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF/IQ-USP). O ensaio biológico foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, após a devida aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF-USP (Protocolo nº 462).

Os animais permaneceram durante todo o experimento nas seguintes condições: foram mantidos em gaiolas de polipropileno (não excedendo a 4 animais por gaiola) com tampa de aço inoxidável e assoalho forrado com maravalha previamente esterilizada, trocada rotineiramente em dias alternados. O ambiente apresentava temperatura de 22°C $\pm$ 2°C, umidade do ar controlada em 55% e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 h. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água filtrada e ração comercial peletizada para roedores de laboratório (Nuvilab CR-1; Nuvital Nutrientes S/A; Colombo/PR; Brasil), recebendo o mesmo lote da ração até o término do experimento. O consumo de ração e os pesos dos animais foram avaliados diariamente.

3.2 Indução de NAFLD

Após uma semana de aclimação, com exceção dos animais não tratados, os demais animais receberam, diariamente, além da ração, 1 mL por 100 g de peso corpóreo (p.c.) de emulsão hiperlipídica, por gavagem, para indução de NAFLD, durante todo o período do experimento (13 semanas), segundo modelo estabelecido por ZOU et al. (2006). A composição dessa emulsão se encontra apresentado no **Quadro 1**.

Quadro 1: Composição nutricional da emulsão hiperlipídica

Componentes	Emulsão (1 mL)	Componentes	Emulsão (1 mL)
Água Destilada (mL)	0,3	Óleo de milho (g)	0,4
Colesterol (g)	0,1	Propilenoglicol (g)	0,0311
Desoxicolato de sódio (g)	0,01	Sacarose (g)	0,15
Leite em pó integral (g)	0,08	Sal de cozinha (g)	0,01
Mix de minerais (g)	0,0015	Tween 80 (g)	0,0364
Mix de vitaminas (g)	0,0025	Total energético (g)	4,342

Adaptado de ZOU et al. (2006).

3.3 Modelo do “Hepatócito Resistente”

Para indução da hepatocarcinogênese foi utilizado o modelo do RH descrito por SOLT e FARBER (1976), modificado por SEMPLE-ROBERTS et al. (1987) e adaptado para ratos *Wistar* por MORENO et al. (1991).

Após 6 semanas de tratamento com a emulsão hiperlipídica, a iniciação da carcinogênese ocorreu pela administração via intraperitoneal, em uma única dose de DEN (DEN; Sigma, EUA; 15 mg/100 g de p.c.) dissolvida em solução de cloreto de sódio 0,9%. Após um período de recuperação de 2 semanas, os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses em dias consecutivos, por gavagem, de 2-acetilaminofluoreno [2-AAF (Sigma, EUA); 2 mg/100 g p.c.] dissolvido em dimetilsufóxido (Sigma, EUA) e óleo de milho (Mazola®, Cargill, Brasil). Vinte e quatro horas após a última aplicação de 2-AAF os animais foram submetidos a um potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial (HP) a 70% (SOLT, FARBER, 1976; CASTRO et al., 2010). Finalmente, no segundo e no quarto dias após a hepatectomia parcial, os animais receberam 2 doses adicionais de 2-AAF (1,0 mg/100 g p.c. e 2,0 mg/100 g p.c., respectivamente). Os animais foram eutanasiados 13 semanas após início da indução da NAFLD.

3.4. Protocolo experimental

Após período de aclimação de 7 dias, 39 animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos:

Grupo não tratado (NT): Composto por 3 animais que não foram submetidos ao modelo do RH e à administração de emulsão hiperlipídica. Esses animais permaneceram nas mesmas condições dos outros grupos experimentais.

Grupo controle isocalórico (CI): Composto por 18 animais que receberam, diariamente por gavagem, durante todo o experimento, emulsão hiperlipídica (1 mL/100 g) e maltodextrina (Nidex®, Nestlé, Brasil; 300 mg/ 100 g p.c.) como controle isocalórico (6 Kcal/g), seis horas após a intubação de emulsão. Na 6ª semana após o início do tratamento, os animais foram submetidos ao modelo do RH e eutanasiados na 13ª semana.

Grupo tributirina (grupo TB): Composto por 18 animais que receberam, diariamente por gavagem, durante todo o experimento, emulsão hiperlipídica (1 mL/100 g), e tributirina (200 mg/ 100 g p.c.), seis horas após a primeira intubação de emulsão. Na 6ª semana após o início do tratamento, os animais foram submetidos ao modelo do RH e eutanasiados na 13ª semana.

O delineamento experimental pode ser observado na **Figura 1**.

Figura 1: Delineamento experimental.

3.5 Eutanásia dos animais e coleta das amostras

Os animais foram anestesiados em câmara saturada com éter etílico (Merck, Brasil), seguindo-se laparotomia. A eutanásia ocorreu por meio de coleta sanguínea, em tubo Gel BD SST® II Advance®, pela aorta abdominal e consequente choque hipovolêmico. Após, as amostras foram centrifugadas para obtenção do soro e o mesmo foi armazenado a -80°C.

O fígado foi retirado, lavado em solução de cloreto de sódio a 0,9% e pesado em balança eletrônica digital, seguindo-se, então, o exame macroscópico. Foram coletados fragmentos hepáticos fixados, em seguida em formalina tamponada a 10% por 24 h para processamento histológico ou congelados em nitrogênio líquido e conservados a -80°C para utilização em técnicas de biologia molecular.

3.6 Exame macroscópico dos fígados

O fígado de cada animal foi examinado individualmente quanto à presença, em sua superfície, de formações nodulares de tamanhos variados e coloração, em geral, esbranquiçada ou amarelada, que se distinguíam do parênquima hepático (**Figura 2**). Essas formações, denominadas nódulos, foram classificadas pelo seu diâmetro em “<1 mm” ou “>1mm”. Após o exame da superfície, cada lobo foi seccionado em fragmentos de aproximadamente 5 mm de espessura, para identificação e contagem das lesões nodulares internas (MORENO *et al.*, 1991).

Figura 2: Fotomacrografias representativas do fígado de ratos Wistar NT (**2A**), Grupo CI (**2B**) e Grupo TB (**2C**). A seta indica a presença de nódulo pré-neoplásico na fase de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese. Além disso, pode ser observada coloração mais amarelada típica da presença de gordura, sendo que no grupo CI (**2B**), esta se apresenta mais proeminente do que no Grupo TB (**2C**).

3.7 Quantificação da apoptose por coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E)

Os corpúsculos apoptóticos (**Figura 3**) foram identificados por critérios morfológicos em lâminas com tecido hepático, coradas e avaliadas pelo método de H&E (LEVIN *et al.*, 1999), utilizando-se o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Axio Imager M2, Carls Zeiss; Alemanha).

A contagem destes corpúsculos foi realizada percorrendo-se 10 campos por lâmina (cerca de 2000 hepatócitos), sendo estes analisados ao redor das LPNs (*surrounding* = tecido considerado “normal”) e dentro das LPNs (persistentes ou em remodelação). Os dados foram expressos como índice apoptótico (%).

Figura 3: Fotomicrografia representativa de corpúsculo apoptótico (seta) observado em corte histológico de fígado corado com H&E. Objetiva de 40X.

3.8. Identificação de glicogênio hepático por coloração com Ácido Periódico-Schiff (PAS)

Fragmentos representativos de fígados foram rotineiramente processados para inclusão em parafina. Após desparafinização, cortes de fígado com 5 μm de espessura foram incubados em ácido periódico (H_5IO_6) 1% por 10 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em reativo de Schiff (Sigma, EUA) por 30 minutos em cuba protegida da luz. Em seguida, os tecidos foram tratados em banho sulforoso [10 ml de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) a 10%, 10ml de HCl 1N e 180 ml de água destilada], realizando-se três banhos a cada três minutos. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina e montagem das lâminas em resina aquosa *faramount aqueous* (DAKO, Dinamarca).

A técnica de coloração foi realizada pelo Professor Dr. Luís Fernando Barbisan do Departamento de Morfologia da UNESP/Botucatu.

3.8.1 Avaliação qualitativa da coloração para PAS

As análises histológicas foram realizadas em cortes hepáticos com 5 µm de espessura marcados com coloração para PAS. A marcação revelou quatro intensidades de marcação, sendo classificados, portanto, em quatro graus:

Grau I: Marcação de intensidade fraca (**Figura 4A**).

Grau II: Marcação de intensidade moderada (**Figura 4B**).

Grau III: Marcação de intensidade forte (**Figura 4C**).

Grau IV: Marcação de intensidade muito forte (**Figura 4D**).

Figura 4: Fotomicrografia representativa de corte histológico de fígado marcado por coloração com PAS. A coloração possibilitou a observação de quatro intensidades de marcação, sendo portanto, classificados em quatro graus: **Grau I:** Marcação de intensidade fraca (**Figura 4A**), **Grau II:** Marcação de intensidade moderada (**Figura 4B**), **Grau III:** Marcação de intensidade forte (**Figura 4C**) e **Grau IV:** Marcação de intensidade muito forte (**Figura 4D**). Objetiva de 10X.

3.9 Marcação imunoistoquímica

3.9.1 Marcação imunoistoquímica para glutathione S-transferase em sua forma placentária (GST-P)

Fragmentos representativos de fígados foram rotineiramente processados para inclusão em parafina. Após desparafinização, cortes de fígado com 5 µm de espessura foram tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em solução salina tamponada com fosfato a 1% [PBS (NaCl 137mM; Na₂HPO₄ 10mM; KCl 2,68mM; KH₂PO₄ 1,76 mM e água ultra-pura, pH 7,40)], durante 20 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas mergulhando-se as lâminas em solução a 3% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé, Brasil) em PBS 1% durante 1 hora.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-GST-P (MBL, Japão), na diluição de 1:1000 em albumina sérica bovina a 1% (BSA 1%) em câmara úmida a 4°C durante 16 horas. Após, as lâminas foram tratadas com anticorpo secundário biotinilado universal (anti-mouse/rabbit) por 30 minutos e, posteriormente, com o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos (LSAB+System-HPR, Dako, Dinamarca).

Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS, e reveladas pela diaminobenzidina (DAB, Sigma, EUA) por 1 minuto. As lâminas foram mantidas em água por 5 minutos. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 1 minuto seguida de diferenciação com água amoniacal e montagem das lâminas em resina aquosa *faramount aqueous* (DAKO, Dinamarca).

Entre todas as etapas foram realizadas 3 lavagens, de 5 minutos, dos cortes em PBS 1%. A especificidade das marcações foi controlada subtraindo-se o anticorpo primário e substituindo-o por PBS 1%.

3.9.1.1 Identificação e quantificação de LPN GST-P positivas

O número (n/cm²), tamanho médio (mm²), e a porcentagem de área do corte ocupada por LPNs GST-P positivas, bem como a área total dos fragmentos hepáticos foram determinados utilizando-se o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha). Foram consideradas pLPN àquelas com coloração homogênea e bordas regulares (**Figura 5A**) e, rLPN àquelas com coloração heterogênea e bordas irregulares (**Figura 5B**) (RIZZI et al, 1997; SCOLASTICI et al., 2014).

Figura 5: Fotomicrografia representativa de corte histológico de fígado marcado com GST-P, A imunomarcagem pela GST-P permite a distinção de lesões pré-neoplásicas persistentes (**5A** - bordas definidas e marcação uniforme), e em remodelação (**5B** - bordas irregulares e marcação não-uniforme no interior do foco). Objetiva de 20X.

3.9.2 Dupla marcação imunoistoquímica para *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA)

Fragmentos representativos de fígados foram rotineiramente processados para inclusão em parafina. Após desparafinização, cortes de fígado com 5 µm de espessura foram tratados com H₂O₂ a 3% em PBS 1% durante 20 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas mergulhando-se as lâminas em solução a 3% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé, Brasil) em PBS 1% durante 1 hora.

Após o bloqueio de proteínas inespecíficas, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-PCNA (Sigma, EUA) na diluição de 1:200 em BSA 1%, em câmara úmida a 4°C durante 16 horas. Após esse período, as lâminas foram tratadas com anticorpo secundário biotilado universal (anti-*mouse/rabbit*) por 30 minutos e, posteriormente, com o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos (LSAB+ System-HPR, Dako, Dinamarca). Após a lavagem das lâminas em PBS 1%, foi realizada a revelação pela DAB (Sigma – EUA) por 1 minuto.

Em seguida, as lâminas foram tratadas com Levamisole (Dako, Dinamarca) para bloqueio da fosfatase alcalina endógena. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com anticorpo anti-GST-P (MBL, Japão) 1:1000 em BSA 1% por 2 horas à temperatura ambiente, seguido de tratamento com sistema de polímero (Dako Cytomation EnVision, Alemanha) durante 45 minutos e revelação com *permanent red* (Dako, Alemanha).

A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 3 minutos seguida de diferenciação com água amoniacal e montagem das lâminas em *Faramount Aqueous* (Dako, Dinamarca).

Entre todas as etapas foram realizadas 3 lavagens, de 5 minutos, dos cortes em PBS 1%. A especificidade das marcações foi controlada subtraindo-se o anticorpo primário e substituindo-o por PBS 1%.

3.9.2.1 Avaliação e quantificação da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pela contagem de núcleos PCNA positivos em fase S (fortemente corados) (FOLEY et al., 1993) no *surrounding* e dentro das LPNs [persistente (**Figura 6A**) e em remodelação (**Figura 6B**)]. A leitura foi realizada percorrendo-se 10 campos por lâmina (cerca de 2000 hepatócitos) e o resultado foi expresso em porcentagem (índice de proliferação celular). Para tanto, foi utilizado o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

Figura 6: Fotomicrografia representativa de corte histológico de fígado marcado para PCNA e GST-P. A dupla marcação imunoistoquímica para PCNA (marrom) e GST-P (rosa) permite a observação de núcleos positivos para PCNA em fase S (fortemente corados), especificamente no *surrounding*, e em LPN, persistentes (**6A**) e em remodelação (**6B**). As setas indicam os núcleos fortemente corados que exibem a marcação para PCNA. Objetiva de 20X.

3.9.3 Marcação imunoistoquímica para *Fibroblast growth factor 21 (FGF-21)*

Fragmentos representativos de fígados foram rotineiramente processados para inclusão em parafina. Após desparafinização, cortes de fígado com 5 µm de espessura foram tratados com H₂O₂ a 3% em PBS 1% durante 20 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas mergulhando-se as lâminas em solução a 3% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé, Brasil) em PBS 1% durante 1 hora.

Após o bloqueio de proteínas inespecíficas, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-FGF 21 (ABCAM, EUA) na diluição de 1:50 em BSA 1%, em câmara úmida a 4°C durante 16 horas. Após esse período, as lâminas foram tratadas com anticorpo secundário biotinilado universal (*anti-mouse/rabbit*) por 30 minutos e, posteriormente, com o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos (LSAB+ System-HPR, Dako, Dinamarca). Após a lavagem das lâminas em PBS 1%, foi realizada a revelação pela DAB (Sigma – EUA) por 1 minuto.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS 1%, e reveladas pela diaminobenzidina (DAB, Sigma, EUA) por 1 minuto. As lâminas foram mantidas em água por 5 minutos. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 1 minuto seguida de diferenciação com água amoniacal e montagem das lâminas em resina aquosa *faramount aqueous* (DAKO, Dinamarca).

Entre todas as etapas foram realizadas 3 lavagens, de 5 minutos, dos cortes em PBS 1%. A especificidade das marcações foi controlada subtraindo-se o anticorpo primário e substituindo-o por PBS 1%.

3.9.3.1 Avaliação qualitativa da marcação imunoistoquímica para FGF-21

As análises histológicas foram realizadas em cortes hepáticos marcados para FGF-21. A marcação imunoistoquímica revelou três intensidades de marcação, sendo classificadas em três graus:

Grau I: Ausência ou marcação de intensidade fraca (**Figura 7A**).

Grau II: Marcação de intensidade moderada (**Figura 7B**).

Grau III: Marcação de intensidade forte (**Figura 7C**).

Figura 7: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado marcados com FGF-21. A marcação imunohistoquímica para FGF-21 possibilitou a observação de três intensidades de marcação, sendo portanto, classificados em três tipos de graus: **Grau I:** Ausência ou marcação de intensidade fraca (7A). **Grau II:** Marcação de intensidade moderada (7B). **Grau III:** Marcação de intensidade forte (7C). Objetiva de 20X.

3.10 Determinação da concentração de AB

A extração do AB foi conduzida de acordo com estudos anteriores (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012). Amostras de tecido hepático foram pulverizadas em graal de porcelana com N₂ líquido e homogeneizadas em um *potter* com 50 mM PMSF (Sigma-Aldrich, EUA) e 50 µL de ácido etilbútrico (Sigma-Aldrich, EUA) em acetonitrila. Os homogenatos foram centrifugados a 13.000 *g* a 4°C durante 15 minutos, e os sobrenadantes foram coletados e armazenados em *vials* a -20°C até o momento da injeção no cromatógrafo. Foram injetados 2 µL em sistema de cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas GC HP6890 (Agilent, EUA) equipado com coluna CP Wax 58 – FFAP (Varian, 25m x 0,32 m x 0,2 µm). A injeção foi realizada em modo splitless a 200°C. O gás de arraste foi hélio no fluxo de 1 mL/minuto.

A temperatura do forno foi mantida a 50°C por 3 minutos e elevada a 250°C na razão de 20°C/minuto. O efluente foi monitorado pelo detector seletivo de massas HP5973 (Agilent, EUA) com ionização de impacto de elétrons com uma fonte de íons a 70 eV a 200°C.

3.11 Determinação da concentração de dialdeído malônico (MDA) no fígado

A concentração de dialdeído malônico no homogenato de fígado foi determinada por meio da sua separação pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como descrito anteriormente por HONG et al. (2000), com adaptações. Esta metodologia consistiu na derivatização do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), no qual um mol de MDA reage com dois moles de TBA, em meio ácido, formando um aduto (TBA-MDA).

A derivatização foi realizada com 50 µL de homogenato diluído 1:5 em tampão fosfato adicionados de 25µL de 2:6 Di-terc-butil-4-metilfenol (BHT) 1% em etanol, 250µL de TBA 39,9 mM, 425 µL de água milli-Q e 750 µL de ácido fosfórico. Após agitação por 10 segundos, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 100°C, por uma hora. Seguida a derivatização pelo calor, as amostras foram resfriadas em banho de gelo. Subsequentemente, foram adicionados 400 µL de etanol-HPLC e 100 µL de NaOH 1 M para cada 500 µL de amostra para a extração do complexo MDA-TBA. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 5 minutos e os sobrenadantes coletados. A análise cromatográfica foi realizada em CLAE (Agilent Technologies 1200 series - Santa Clara USA) conectado a um computador. O conjugado MDA-TBA (20 µL) foi injetado em uma coluna analítica de fase reversa Phenomenex C18 (250 mm x 4.6 mm; cinco mm – Phenomenex, Torrance, USA) com pré-coluna LC8-D8 (Phenomenex AJ0-1287 – Torrance, USA) e quantificado fluoremetricamente a uma excitação de 515 nm e emissão de 543 nm. A taxa de fluxo da bomba foi 1,0 mL/ min com fase móvel constituída de 60% de tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7.0 e 40% de metanol.

Por fim, foi preparado uma curva de calibração utilizando-se MDA (Fluka 63287) nas concentrações 0,5 a 15,0 µmol. A partir da equação da reta gerada por essa curva, foi realizado o cálculo da concentração de MDA nas amostras de homogenato. A cada corrida feita no CLAE, foi preparado o branco com água ultra-pura e um controle externo constituído pelo MDA (Fluka 63287), na concentração de 5 µmol.

3.12 Determinação sérica do perfil lipídico e das enzimas hepáticas ALT e AST

As concentrações séricas de colesterol total, HDL-colesterol (HDL), LDL-colesterol (LDL), triacilgliceróis, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), foram realizadas em um analisador bioquímico (Labmax 240), utilizando *kits* disponíveis comercialmente (Labtest, Brasil).

3.13 Determinação hepática de colesterol total e triacilgliceróis

A extração dos lipídios hepáticos foi realizada de acordo com metodologia proposta por HARA, RADIN (1978). Nesse método, 60 mg de tecido hepático foram triturados previamente e homogeneizados em 1,125 mL de hexano:isopropanol (3:2) e deixados overnight à temperatura de 4°C. Após 16 horas, o homogenato foi centrifugado a 1.000 g por 15 minutos, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Neste outro tubo, foi adicionado 1,5 mL de sulfato de sódio a 6,6%. Após decantar por 15 minutos, 200 µL da fase superior foram coletados e transferidos para um novo tubo, para subsequente evaporação sob N₂ e reconstituição em 400 µL de isopropanol. As análises de colesterol total e triacilgliceróis foram realizadas em um analisador bioquímico (Labmax 240), utilizando *kits* disponíveis comercialmente (Labtest, Brasil).

3.14 Extração de proteína total

Para a obtenção de extratos protéticos de frações celulares, foi utilizado o kit de extração T-PER® (Pierce, EUA), segundo o manual de instruções do fabricante. Para tanto, foram pesados cerca de 60 mg de tecido hepático. Em seguida, foi realizada a lise celular e purificação do extrato para obtenção da fração proteica. Após, o extrato foi armazenamento a -80°C.

3.15 Extração ácida de histonas

A metodologia empregada para extração ácida de histonas foi adaptada dos protocolos de JEONG et al. (2003) e DRUESNE et al. (2004) para utilização em cortes de fígado obtidos por ocasião da eutanásia. Inicialmente 50 mg de tecido foram homogeneizados em *dounce* com tampão de lise gelado (Tris 10 mM; bissulfito de sódio 50 mM; Triton X-100 1%; MgCl₂ 10 mM; sacarose 8,6%; PMSF e água ultra-pura, pH 6,5).

Em seguida, os núcleos dos hepatócitos foram separados por centrifugação à 700 g por 15 minutos a 4°C, lavados com o tampão Tris-EDTA (Tris 10 mM; EDTA 13 mM; PMSF, água ultra-pura, pH 8,0) e novamente centrifugados à 700 g por 15 minutos a 4°C para formação de *pellets*. Esses *pellets* foram então ressuspensos com H₂SO₄ 0,6 N e incubados *overnight* a 4°C para separação da fração solúvel em ácido. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4°C, a fração sobrenadante foi incubada *overnight* com acetona a -20°C para precipitação das histonas. Assim, após centrifugação a 12.000 g por 5 minutos a 4°C, o pellet foi neutralizado com NaOH 3N e em seguida ressuspensos em tampão de carregamento (uréia 5,8 M; ácido acético glacial 0,9 M; glicerol 16%; verde de metila 0,2%; 2-mercaptoetanol 4,8% e água ultra-pura) e armazenados a -80°C até o momento do uso.

3.16 Western blot para Caspase 3, H3K9 acetilada e PPAR- α

As amostras de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com os anticorpos anti Caspase 3 clivada (diluição 1:500; Cell Signaling, EUA), anti-H3K9 acetilada (diluição 1:1000; Upstate, EUA) e anti-PPAR- α (diluição 1:1000; Cell Signaling, EUA).

Após a incubação das membranas com os anticorpos primários específicos, foi realizada a reação com os anticorpos secundários IgG (ECL®, Amersham Biosciences, Suécia) e na sequência com o segundo anticorpo primário anti- β actina (diluição 1:10.000), que consiste em controle constitutivo, seguindo-se novamente a incubação com o anticorpo secundário específico. Entre todas as etapas foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada, com tampão PBS 1%.

A detecção dos imunocomplexos ocorreu por quimioluminescência com o conjunto de reagentes específico (ECL® Amersham Biosciences, Suécia), utilizando o sistema de aquisição de imagens ImageQuant 400 (GE Healthcare, Reino Unido). As bandas foram quantificadas utilizando-se software específico (Molecular Analyst®, BIO-RAD, EUA).

3.17 Avaliação da expressão gênica de FGF-21

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: *Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* (BUSTIN et al., 2009). A extração do RNA foi realizada com o kit Illustra RNAspin (GE, EUA) segundo as instruções do fabricante.

As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNase (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando-se o equipamento Nanodrop (Thermo Scientific, EUA). A transcrição reversa dos mRNAs obtidos do fígado foi realizada com o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Life Technologies, EUA), seguindo-se as orientações do fabricante.

Cada amostra de cDNA foi analisada com ensaios TaqMan (Life Technologies, EUA), contendo primers e sondas de hidrólise específicos para FGF-21 (Applied Biosystems Rn00562048_m1) e Gapdh (controle endógeno, Applied Biosystems 4352338E). Para cada reação foram utilizados 10 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X) (Life Technologies, EUA), 4 µL do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 20 µL com água livre de nucleases.

Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As reações foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real Step One Plus HT (Life Technologies, EUA). Os valores de ciclo de quantificação (Cq) foram calculados com o auxílio do software SDS 2.1, utilizando-se a configuração automática de *baseline* e *threshold*. O Cq refere-se ao ponto de encontro entre a curva de amplificação corrigida pelo *baseline* e o *threshold* (de acordo com o RDML, <http://rdml.org>) (LEFEVER et al., 2009). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001).

3.18 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (teste de Brown-Forsythe). Quando atendidos esses critérios, foi aplicado o Test *t* de Student não pareado. Quando não foi observada distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, foi adotado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e o nível de significância utilizado de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA 7.0 (Statsoft, EUA).

4. Resultados

4.1 Curva ponderal e consumo de ração

A **Figura 8** demonstra a curva ponderal, durante as 13 semanas do estudo, dos dois grupos experimentais, Grupo TB e Grupo CI, que foram submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD. Pode-se observar que os animais do Grupo TB, bem como os animais do Grupo CI ganharam massa corpórea de forma homogênea durante todo o experimento, exceto após a administração intraperitoneal de DEN, que resultou em uma redução ponderal em ambos os grupos, que perdurou por uma semana. Contudo, não foram observadas, diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nos pesos corpóreos entre os grupos.

Figura 8: Evolução de peso corpóreo dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD; DEN = dietilnitrosamina; 2-AAF = 2-acetilaminofluoreno.

Em relação ao consumo de ração, observa-se na **Figura 9** que durante as 13 semanas de estudo, os animais do Grupo TB, bem como os animais do Grupo CI reduziram o consumo, assim como esperado. Em ambos os grupos experimentais, esta redução se deu desde o início do experimento e perdurou até a dose necrogênica de DEN, o qual se manteve constante até a primeira dose intragástrica de 2-AAF. Após a 1ª dose de 2-AAF, houve uma redução não significativa ($p \geq 0,05$) no consumo de ração em ambos os grupos, até a hepatectomia parcial à 70%. Após o procedimento cirúrgico, houve uma sutil elevação no consumo de ração no Grupo TB, bem como no Grupo CI. Entretanto, não foi observada diferença significativa ($p \geq 0,05$) no consumo de ração entre os grupos.

Figura 9: Evolução do consumo de ração dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD; DEN = dietilnitrosamina; 2-AAF = 2-acetilaminofluoreno.

4.2 Pesos corpóreos iniciais e finais, hepáticos absolutos e relativos dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

Foram avaliados os pesos corpóreos iniciais e finais, hepáticos absolutos e relativos dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD. Contudo, não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os parâmetros analisados entre os grupos, como podem ser observados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Pesos corpóreos iniciais e finais, hepático absoluto e relativo dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.

Grupo (n)	Peso corpóreo inicial (g)	Peso corpóreo final (g)	Peso hepático absoluto (g)	Peso hepático relativo (%)
Grupo CI (13)	131 ± 3,41	358 ± 8,70	12,36 ± 0,55	3,37 ± 0,12
Grupo TB (10)	132 ± 5,21	350 ± 8,68	13,78 ± 0,58	3,92 ± 0,09

Dados expressos como média ± EPM; Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos de acordo com o teste *t* de Student não pareado. n = número de animais.

Além disso, pode-se observar na **Tabela 1**, a homogeneidade dos pesos corpóreos iniciais e finais dos animais do Grupo TB e do Grupo CI, sugerindo a correta aleatorização entre os grupos, bem como a escolha adequada da dose de TB, que não resultou em toxicidade durante as 13 semanas consecutivas de tratamento.

4.3 Macroscopia

O fígado de cada animal foi examinado individualmente quanto à presença, em sua superfície, de formações nodulares de tamanhos variados e coloração, em geral, esbranquiçada ou amarelada, que se distinguiam do parênquima hepático, como pode ser observado na **Figura 10A**. A análise macroscópica revelou que os fígados dos animais do Grupo TB (**Figura 10C**), bem como os fígados dos animais do Grupo CI (**Figura 10B**) apresentaram coloração amarelada, sugerindo a presença de NAFLD.

Figura 10: Fotomacrografias representativas do fígado de ratos *Wistar NT* (**10A**), e dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD. As setas indicam a presença de nódulos pré-neoplásicos na fase de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese. Além disso, pode ser observada a coloração amarelada menos proeminente no grupo TB (**10C**), quando comparada ao Grupo CI (**10B**).

4.4 Determinação da concentração hepática de AB dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

A determinação da concentração hepática de AB revelou que o Grupo TB apresentou maior ($p < 0,05$) concentração de AB quando comparado com o grupo controle, como pode ser observado na **Figura 11**.

Figura 11: Concentração hepática de ácido butírico (AB) dos animais do Grupo TB (n = 5) e do Grupo CI (n = 7) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD. Dados expressos como média $\pm$ EPM; Diferença significativa ($p < 0,05$), em * no Grupo TB quando comparado ao grupo CI de acordo com o teste *t* de Student não pareado. n = número de animais.

4.5 Análise morfométrica de LPNs GST-P positivas dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

Os resultados de morfometria revelaram que o tratamento com TB resultou em maior ($p < 0,05$) área de pLPN, bem como de rLPN quando comparado ao grupo controle. Contudo, o Grupo TB apresentou menor ($p < 0,05$) número de pLPN quando comparado ao Grupo CI. Por outro lado, os grupos não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) no número de rLPN, bem como na porcentagem do corte da área do fígado ocupada por LPNs (pLPN e rLPN) positivas para GST-P, como pode ser observado na **Tabela 2**.

Tabela 2: Análise morfométrica pela marcação com GST-P do fígado dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.

Grupo (n)	Número de LPN positivas para GST-P por cm ²		Tamanho das LPN positivas para GST-P (mm ²)		% da área do corte do fígado ocupada por LPN	
	pLPN	rLPN	pLPN	rLPN	pLPN	rLPN
Grupo CI (13)	40,8 ± 2	50,7 ± 3	0,32 ± 0,03	0,27 ± 0,03	13,22 ± 1,42	15,1 ± 3,03
Grupo TB (10)	27,5 ± 2*	46,0 ± 3	0,52 ± 0,04*	0,42 ± 0,03	14,41 ± 1,55	17,2 ± 1,07

Dados expressos como média ± EPM; Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em pLPN* e em rLPN**, quando comparado ao grupo CI de acordo com o teste *t* de Student não pareado. n = número de animais.

4.6 Quantificação da apoptose por coloração de H&E dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

Os resultados de apoptose por coloração de H&E revelaram que o tratamento com TB resultou em maior ($p < 0,05$) índice apoptótico em pLPN e em rLPN, quando comparados ao grupo controle. Contudo, não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre o *surrounding* dos grupos, como pode ser observado no **Figura 12**.

Figura 12: Quantificação do índice apoptótico (%) do fígado dos animais do Grupo TB ($n = 10$) e do Grupo CI ($n = 13$) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD. Diferença significativa ($p < 0,05$) em pLPN* e em rLPN**, quando comparado ao Grupo CI de acordo com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. n = número de animais.

4.7 Western blot para Caspase 3 clivada

Observou-se que o Grupo TB apresentou maior ($p < 0,05$) expressão em nível proteico de Caspase 3 clivada quando comparado ao grupo controle, como pode ser observado na **Figura 13**.

Figura 13: Expressão em nível proteico de caspase 3 clivada dos animais do Grupo TB (n = 6) e do Grupo CI (n = 6) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD. Dados expressos como média $\pm$ EPM; *Diferença significativa ($p < 0,05$) no Grupo TB quando comparadas às do Grupo CI de acordo com o teste t de Student não pareado. n = número de animais.

4.8 Análise da proliferação celular dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

Pode ser observado na **Figura 14** que o Grupo TB apresentou menor ($p < 0,05$) índice de proliferação em pLPN, bem como em rLPN quando comparado ao Grupo CI. Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os *surroundings* dos grupos.

Figura 14: Quantificação do índice de proliferação celular (%) do fígado dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD; Diferença significativa ($p < 0,05$) em pLPN* e em rLPN**, quando comparado ao Grupo CI de acordo com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. n = número de animais.

4.9 Determinação das enzimas hepáticas séricas ALT e AST, dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

Os resultados bioquímicos da determinação das enzimas hepáticas séricas, ALT e AST, dos animais do Grupo TB (n = 9) e dos animais do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD, não revelaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os grupos, como podem ser observados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Determinação das enzimas hepáticas séricas ALT e AST, dos animais do Grupo TB (n = 9) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.

Grupo (n)	Alanina aminotransferase (ALT U/L)	Aspartato aminotransferase (AST U/L)
Grupo CI (13)	50 ± 2,53	148 ± 3,28
Grupo TB (9)	53 ± 3,27	144 ± 1,90

Dados expressos como média ± EPM; não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os grupos de acordo com teste *t* de Student não pareado. n = número de animais.

4.9 Determinação do perfil lipídico sérico dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

A determinação do perfil lipídico sérico revelou que o Grupo TB apresentou menor ($p < 0,05$) concentração de LDL-colesterol, quando comparado com o Grupo CI. Contudo, o tratamento com TB aumentou ($p < 0,05$) a concentração sérica de HDL-colesterol quando comparado ao grupo controle. Além disso, não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nas concentrações de Colesterol Total, VLDL-colesterol e Triacilgliceróis entre os grupos, como pode ser observado na **Tabela 4**.

Tabela 4: Análise dos parâmetros de perfil lipídico sérico: Colesterol Total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e Triacilgliceróis dos animais do Grupo TB ($n = 9$) e do Grupo CI ($n = 13$) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.

Grupo (n)	Colesterol Total (mg/dL)	HDL-Colesterol (mg/dL)	LDL-Colesterol (mg/dL)	VLDL-Colesterol (mg/dL)	Triacilgliceróis (mg/dL)
Grupo CI (13)	94 $\pm$ 3,05	38 $\pm$ 1,38	46 $\pm$ 2,53	10 $\pm$ 0,30	52 $\pm$ 1,52
Grupo TB (9)	82 $\pm$ 5,26	44 $\pm$ 2,55*	28 $\pm$ 2,84*	11 $\pm$ 0,29	53 $\pm$ 1,47

Dados expressos como média $\pm$ EPM; Diferença significativa ($p < 0,05$), em * no Grupo TB quando comparado ao grupo CI de acordo com o teste t de Student não pareado. n = número de animais.

4.10 Determinação das concentrações hepáticas de colesterol total e triacilgliceróis dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

A determinação das concentrações hepáticas de colesterol total e triacilgliceróis revelou que o Grupo TB apresentou menor ($p < 0,05$) concentração de Colesterol total quando comparado com o Grupo CI. Contudo, não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) nas concentrações hepáticas de Triacilgliceróis entre os grupos, como pode ser observado na **Tabela 5**.

Tabela 5: Determinação das concentrações hepáticas de Colesterol Total e Triacilgliceróis dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.

Grupo (n)	Colesterol total hepático (mg/g de tecido)	Triacilgliceróis hepáticos (mg/g de tecido)
Grupo CI (13)	29 ± 2,81	32 ± 2,80
Grupo TB (10)	18 ± 1,33*	25 ± 1,33

Dados expressos como média ± EPM; Diferença significativa ($p < 0,05$), em * no Grupo TB quando comparado ao grupo CI de acordo com o teste *t* de Student não pareado. n = número de animais.

4.11 Concentração de MDA em homogenato de tecido hepático dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

A concentração de MDA em homogenato de tecido hepático revelou que os animais tratados com TB apresentaram menor ($p < 0,05$) concentração de MDA, quando comparado com o Grupo CI, como pode ser observado na **Figura 15**.

Figura 15: Concentrações hepáticas de MDA/μg de proteínas dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD. Diferença significativa ($p < 0,05$), em * no Grupo TB quando comparado ao grupo CI de acordo com o teste *t* de Student não pareado. n = número de animais.

4.12 Avaliação qualitativa da coloração para PAS dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

A coloração para PAS possibilitou a observação de quatro intensidades de marcação sendo, portanto, classificados em quatro graus, como observado na **Figura 16**: **Grau I**: Marcação de intensidade fraca (**Figura 16A**), **Grau II**: Marcação de intensidade moderada (**Figura 16B**), **Grau III**: Marcação de intensidade forte (**Figura 16C**) e **Grau IV**: Marcação de intensidade muito forte (**Figura 16D**). Em relação a análise por PAS, embora, o presente estudo não tenha revelado diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os dois grupos experimentais, o score entre os graus de marcação apresentou tendência ($p = 0,07$) no Grupo TB quando comparado ao grupo CI, como pode ser observado na **Tabela 6**.

Figura 16: Fotomicrografia representativa de corte histológico de fígado marcado por coloração com PAS. A coloração possibilitou a observação de quatro intensidades de marcação, sendo portanto, classificados em quatro graus: **Grau I**: Marcação de intensidade fraca (**Figura 16A**), **Grau II**: Marcação de intensidade moderada (**Figura 16B**), **Grau III**: Marcação de intensidade forte (**Figura 16C**) e **Grau IV**: Marcação de intensidade muito forte (**Figura 16D**). Objetiva de 10X.

Tabela 6: Avaliação qualitativa da coloração para PAS dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.

Grupo (n)	Grau I (%)	Grau II (%)	Grau III (%)	Grau IV (%)	Score
Grupo CI (13)	8	38	38	15	2,3
Grupo TB (10)	0	30	50	20	2,6 [†]

Dados expressos em porcentagem; não houve diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre os grupos de acordo com teste *t* de Student não pareado. Tendência ($p = 0,07$), em [†] no Grupo TB quando comparado ao Grupo CI. n = número de animais.

4.13 Western blot para histona H3K9 acetilada

Em relação à acetilação da histona H3K9, os animais tratados com a tributirina apresentaram maior expressão em nível proteico em comparação aos ratos do grupo controle, como pode ser observado na **Figura 17**. Embora, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre os dois grupos experimentais.

Figura 17: Expressão em nível proteico da histona H3K9 acetilada dos animais do Grupo TB (n = 6) e do Grupo CI (n = 6) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD; não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os grupos de acordo com teste *t* de Student não pareado. n = número de animais.

4.14 Expressão gênica de FGF-21 dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

Em relação à expressão gênica de FGF-21 (**Figura 18**), os animais do Grupo TB apresentaram maior ($p < 0,05$) expressão em comparação aos ratos do grupo controle (Grupo CI).

Figura 18: Expressão gênica de FGF-21 dos animais do Grupo TB ($n = 4$) e do Grupo CI ($n = 4$) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD. Dados expressos como média $\pm$ EPM; Diferença significativa ($p < 0,05$), em * no Grupo TB quando comparado ao grupo CI de acordo com o teste t de Student não pareado. n = número de animais.

4.15 Avaliação qualitativa da marcação imunoistoquímica para FGF-21 dos animais do Grupo TB e do Grupo CI submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD

A marcação imunoistoquímica para FGF-21 em tecido hepático resultou em uma análise qualitativa por meio da intensidade de coloração nestes tecidos sendo, portanto, classificados em três graus, como pode ser observado na **Figura 19**: **Grau I:** Ausência ou marcação de intensidade fraca (**Figura 19A**). **Grau II:** Marcação de intensidade moderada (**Figura 19B**) e **Grau III:** Marcação de intensidade forte (**Figura 19C**). Os animais tratados com a tributirina apresentaram maior score de marcação (**Tabela 7**) quando comparados aos ratos do grupo controle isocalórico, embora, não foram observadas diferenças significativas entre os três graus de marcação entre os dois grupos experimentais.

Figura 19: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD, marcados com FGF-21. A marcação imunoistoquímica para FGF-21 possibilitou a observação de três intensidades de marcação sendo, portanto, classificados em três tipos de graus: **Grau I:** Ausência ou marcação de intensidade fraca (20A). **Grau II:** Marcação de intensidade moderada (20B). **Grau III:** Marcação de intensidade forte (20C). Objetiva de 20X.

Tabela 7: Avaliação qualitativa da marcação imunoistoquímica para FGF-21 dos animais do Grupo TB (n = 10) e do Grupo CI (n = 13) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.

Grupo (n)	Grau I (%)	Grau II (%)	Grau III (%)	Score
Grupo CI (13)	62	31	8	1,4
Grupo TB (10)	0	10	90	2,9*

Dados expressos em porcentagem; Diferença significativa ($p < 0,05$), em * no Grupo TB quando comparado ao grupo CI de acordo com o teste *t* de Student não pareado. n = número de animais.

4.12 Western blot para PPAR- α

A análise de expressão em nível proteico de PPAR- α revelou que o Grupo TB apresentou maior ($p < 0,05$) expressão em comparação ao Grupo CI, como pode ser observado na **Figura 20**.

Figura 20: Expressão em nível proteico de PPAR- α dos animais do Grupo TB ($n = 7$) e do Grupo CI ($n = 7$) submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD; Diferença significativa ($p < 0,05$), em * no Grupo TB quando comparado ao grupo CI de acordo com o teste t de Student não pareado. n = número de animais.

5. Discussão

Inúmeros estudos epidemiológicos, em animais e clínicos fornecem evidências de que a prevenção continua sendo a abordagem mais promissora para reduzir a incidência e a mortalidade por diversos tipos de câncer (UMAR, DUNN, GREENWALD, 2012). Além disso, sugere-se que o tratamento quimiopreventivo nos estágios iniciais da carcinogênese, bem como a intervenção em diversos fatores de risco, como a NAFLD, poderiam aumentar a eficácia da quimioprevenção em diversos tipos de câncer, como o HCC (SINGH et al., 2013).

Assim, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar o efeito quimiopreventivo da TB nas etapas de iniciação/promoção inicial em ratos *Wistar* submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.

Durante as 13 semanas do experimento, foi adotado o modelo modificado de NAFLD proposto por ZOU et al. (2006; HEBBARD, GEORGE, 2011) a fim de se associar a NAFLD ao modelo do RH. No modelo de ZOU et al. (2006), pode ser observado que após 6 semanas de administração de emulsão hiperlipídica, há o aumento das concentrações séricas de colesterol total, triacilgliceróis, e de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , além de ser observada hiperinsulinemia, hiperglicemia, resistência à insulina, bem como lesões mitocondriais e inflamação hepática em ratos *Sprague-Dawley*, sendo, portanto, um modelo relevante para o estudo da NAFLD, principalmente por ser semelhante ao que se observa em seres humanos.

Contudo, existem outros modelos que atuam na redução da exportação e do catabolismo hepático de lipídios, como dietas com deficiência em colina e/ou metionina, e modelos que aumentam a produção e importação hepática de lipídios, como dietas hipercalóricas e hiperlipídicas (HEBBARD, GEORGE, 2011).

As dietas deficientes em colina e/ou metionina são adequadas para promover a NAFLD induzindo esteatose hepática grave, necroinflamação e fibrose (HEBBARD, GEORGE, 2011). No entanto, a principal desvantagem da utilização destes modelos é que o perfil metabólico observado é inverso ao que ocorre em humanos, onde há a redução das concentrações séricas de glicose em jejum, insulina e leptina, bem com sensibilidade periférica à insulina e adiponectinas em concentrações basais (RINELLA et al., 2008; TAKAHASHI et al, 2012), sendo, portanto, pouco representativos da NAFLD em humanos.

Por outro lado, modelos experimentais que utilizam rações hiperlipídicas e hipercalóricas também são utilizadas para induzir a NAFLD (HEBBARD, GEORGE, 2011; NAKAMURA, TERAUCHI, 2013). Nestes modelos, os animais demonstram esteatose e inflamação hepática, estresse oxidativo e fibrose, além de apresentar parâmetros

metabólicos semelhantes àqueles encontrados em humanos (HEBBARD, GEORGE, 2011). Contudo, estes modelos têm algumas desvantagens como variação na composição lipídica da ração, quantidade de gordura, duração da dieta e a espécie de animal escolhida, podem resultar em alterações no grau de esteatose, inflamação e fibrose e, desta forma, não mimetizar as condições que ocorrem em seres humanos (TAKAHASHI et al, 2012).

Assim, no presente estudo após 13 semanas de experimento com a administração diária da emulsão hiperlipídica e associação do modelo do RH, a curva ponderal e o consumo de ração, como podem ser observados nas **Figuras 9 e 10**, respectivamente, bem com os pesos corpóreos iniciais e finais, hepáticos absolutos e relativos (**Tabela 1**), foram semelhantes entre os dois grupos experimentais. Além disso, não foram observados sinais de toxicidade, nem efeitos deletérios relacionados aos tratamentos com tributirina ou maltodextrina, assim como em estudos prévios com a tributirina (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012; GUARIENTO et al., 2014; ORTEGA et al., 2016).

A análise macroscópica revelou que os fígados dos animais do Grupo TB (**Figura 11C**), bem como os fígados dos animais do Grupo CI (**Figura 11B**) apresentaram coloração amarelada, sugerindo a presença de NAFLD.

No presente estudo, determinou-se as concentrações hepáticas de AB, a fim de se atribuir o efeito quimiopreventivo em LPNs à tributirina, assim como observado em estudos anteriores (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012; HEIDOR et al., 2016). A análise por cromatografia a gás revelou que o grupo dos animais tratados com a tributirina apresentou uma concentração de AB 2.118 vezes superiores ($p < 0.05$) às concentrações de AB constatadas no grupo controle, como pode ser observado na **Figura 12**. Nesse sentido, conclui-se que o aumento das concentrações hepáticas de AB observadas no presente estudo também poderia resultar em um efeito quimiopreventivo em modelo de carcinogênese associada à NAFLD.

Assim, em relação aos dados de morfometria de LPNs, a atividade quimiopreventiva da tributirina foi observada a partir da redução ($p < 0,05$) significativa do número de pLPN em comparação ao grupo controle (**Tabela 2**). A área das pLPNs, contudo, foi maior ($p < 0,05$) no Grupo TB quando comparada à do grupo controle isocalórico. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) no número e na área de rLPN, bem como na % da área do corte do fígado ocupada por LPNs entre os dois grupos experimentais, como pode ser constatado na **Tabela 2**.

Por outro lado, KUROIWA-TRZMIELINA et al. (2009) demonstraram que o tratamento com tributirina (200 mg/ 100 g de p.c.), administrado nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese resultou em menor área de pLPN no

Grupo TB quando comparado ao grupo controle. Embora, sem diferença significativa o número de pLPNs dos animais tratados com a tributirina foi também menor do que o do grupo controle no estudo de KUROIWA-TRZMIELINA et al. (2009), o que está de acordo com a presente observação.

Além disso, de CONTI et al. (2012) demonstraram também que os tratamentos com a tributirina (200 mg/ 100 g de p.c.) isoladamente ou em associação com a Vitamina A (1 mg/100 g de p.c.), resultaram em menor área de pLPNs na etapa de promoção da hepatocarcinogênese. Da mesma forma, em outro estudo de nosso grupo, GUARIENTO et al. (2014) também se observou que a associação da tributirina (100 mg/ 100 g de p.c.) com o ácido fólico (0,08mg/100 g p.c.), resultou em menor área de pLPNs e de rLPNs, na etapa de promoção da hepatocarcinogênese, quando comparada ao grupo controle. Neste último caso, foi observada, além disso, redução do número de pLPNs e de rLPNs, bem como na % da área do corte ocupada por LPNs.

Portanto, conclui-se que a redução do número das pLPNs constatadas nos animais tratados com a tributirina poderia estar relacionada neste estudo às pronunciadas concentrações de AB no fígado destes animais. No entanto, sugere-se que a presença de ácidos graxos no interior dos hepatócitos possa estar interferindo na ação quimiopreventiva da tributirina em relação à redução da área destas pLPNs.

A avaliação da apoptose e da proliferação celular, são essenciais no estudo de agentes quimiopreventivos (MUSKHELISHVILI et al., 2003; HEIDOR et al., 2012). Em relação aos resultados de apoptose, o tratamento com tributirina resultou aqui em maior ($p < 0,05$) índice apoptótico tanto em pLPNs com em rLPNs, quando comparados ao grupo controle, como pode ser observado na **Figura 13**. Assim, como constatado em estudos anteriores (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012; GUARIENTO et al., 2014; HEIDOR et al., 2016; ORTEGA et al., 2016), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre os *surroundings* dos dois grupos experimentais.

Em um estudo *in vivo* na fase de promoção da hepatocarcinogênese, de CONTI et al. (2012) demonstraram que os tratamentos com a tributirina (200 mg/ 100 g de p.c.) isoladamente ou em associação com a Vitamina A (1 mg/100 g de p.c.) resultaram em maior apoptose em pLPNs em comparação ao grupo controle. Além disso, os resultados de apoptose das rLPNs também corroboraram com estudos prévios, sendo observado aumento da apoptose em rLPNs na etapa de iniciação/promoção inicial (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009), bem como na etapa de promoção da hepatocarcinogênese (de CONTI et al., 2012; GUARIENTO et al., 2014; HEIDOR et al., 2016; ORTEGA et al., 2016). Sugere-se no presente estudo, que o aumento da apoptose em pLPNs no Grupo

TB, poderia estar relacionado a um mecanismo compensatório ao aumento da área destas pLPNs, assim como observado na **Tabela 2**.

A indução da apoptose pode ser iniciada por vias alternativas dependentes de caspase: a via extrínseca, modulada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática (BUDIHARDJO et al., 1999; IGNEY, KRAMMER, 2002); ou por meio da via intrínseca, associada ao aumento da permeabilidade mitocondrial. Em ambas as vias, observa-se a ativação da Caspase 3, considerada o ponto irreversível da cascata de indução da apoptose (BUDIHARDJO et al., 1999). Assim, no presente estudo, demonstrou-se que os animais tratados com a tributirina apresentaram maior ($p < 0,05$) ativação de Caspase 3 do que os ratos do grupo controle isocalórico (**Figura 14**).

De forma semelhante, a tributirina também aumentou a apoptose nas etapas iniciais da carcinogênese (dados ainda não publicados por nosso grupo), bem como em linhagem de câncer de cólon por meio do aumento da expressão em nível proteico de Caspase 3 (CLARKE et al. 2001). Além disso, em estudos *in vitro* com o AB, também se observou o aumento da apoptose em células T, quando comparado com células que não receberam o tratamento com AB (KURITA-OCHIAI, OCHIAI, FUKUSHIMA, 2001), e em células de glioma humano (KOMATA et al., 2005) por meio da ativação de caspases. De acordo com os dados apresentados neste experimento, conclui-se que a ativação de Caspase 3 resultou na indução da apoptose no Grupo TB em pLPN e em rLPN.

Em relação à avaliação da proliferação celular, os animais do grupo tributirina apresentaram redução ($p < 0,05$) do índice de proliferação tanto em pLPNs como em rLPNs, quando comparados ao do grupo controle isocalórico, como pode ser observado na **Figura 15**. Em estudos *in vivo*, embora, sem diferença estatisticamente significativa, observou-se que a tributirina também reduziu o índice de proliferação celular em pLPNs e em rLPNs nas etapas de iniciação/promoção inicial (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009), bem como na etapa de promoção da hepatocarcinogênese (de CONTI et al., 2012; GUARIENTO et al., 2013; HEIDOR et al., 2016; ORTEGA et al., 2016). Assim como constatado em estudos anteriores (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012; GUARIENTO et al., 2014; ORTEGA et al., 2016; HEIDOR et al., 2016), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os *surroundings* dos diversos grupos.

Em estudos *in vitro*, o tratamento com concentrações reduzidas de tributirina também se revelou um potente inibidor da proliferação celular, principalmente em linhagens de câncer de colo de útero, mama, leucemia (VECCHIA et al., 1997), próstata (MAIER, et al., 2000), adenocarcinoma de cólon (NAKANO et al. 1997; SCHRÖDER, et al., 2002), e no hepatocarcinoma (SAITO et al., 1998; YAMAMOTO et al., 1998). Nesse

sentido, GABRIELLI et al. (2004), demonstraram que o tratamento *in vitro* com concentrações reduzidas de AB também resultou em inibição da proliferação celular em linhagem de câncer cervical. No entanto, estes autores observaram que um aumento gradual das concentrações de AB resultou em maior efeito citostático e apoptótico em linhagem de câncer cervical, sugerindo uma relação dose-resposta. Desta forma, sugere-se que no presente estudo a redução significativa da proliferação celular possa estar relacionada à associação do AB, um ácido graxo de cadeia curta, ao acúmulo de ácidos graxos no interior dos hepatócitos, resultando em uma possível liberação controlada de AB. Além disso, o aumento da apoptose em pLPN e em rLPN poderia ser proveniente do efeito citotóxico do AB, promovendo dessa forma, o estresse celular e a subsequente ativação de Caspase 3.

A análise das concentrações séricas das aminotransferases ALT e AST, é considerada relevante na avaliação de hepatotoxicidade de diversas afecções como a NAFLD, em que o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos pode resultar em diversas alterações metabólicas prejudiciais (KÄLSCH et al., 2015). Assim, foram avaliadas no presente estudo as concentrações séricas de ALT e AST nos animais tratados com a tributirina, bem como nos animais do grupo controle isocalórico. A análise bioquímica das concentrações séricas de ALT e AST não revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre os grupos, como pode ser observado na **Tabela 3**.

Da mesma forma, VINOLO et al. (2012), também não observaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações séricas de ALT e AST em animais tratados com a tributirina (200 mg/ 100 g de p.c.) e ração hiperlipídica (26,0% de carboidratos, 59,1% de banha de porco e 14,9% de proteínas) quando comparada ao grupo controle. Por outro lado, ZHOU et al. (2017), observaram que o grupo dos animais tratados com butirato de sódio (2 g/ 100 g p.c.) e dieta hiperlipídica (88% de dieta padrão, 10% de banha de porco e 2% de colesterol), apresentou concentrações séricas reduzidas de ALT e AST quando comparado ao grupo controle. Além disso, RASO et al. (2013), observaram que animais tratados com tributirina (200 mg/ 100 g de p.c.) e, dieta hiperlipídica (24% de carboidratos, 58% de gorduras e 18% de proteínas), apresentaram menores concentrações séricas de ALT e AST quando comparados a ratos do grupo controle. Assim, os tratamentos com tributirina (200 mg/ 100 g de p.c.) ou a administração de butirato de sódio (2 g/ 100 g p.c.), associados a rações hiperlipídicas, resultam em dados contraditórios. Conclui-se na presente investigação que não houve efeito hepatotóxico nos dois grupos experimentais. Além disso, sugere-se, portanto, que a composição da ração hiperlipídica poderia influenciar os resultados de ALT e AST.

Em relação à determinação do perfil lipídico sérico, o Grupo TB apresentou menor concentração de LDL-colesterol, quando comparado com o Grupo CI, como pode ser

observado na **Tabela 4**. Este dado está de acordo com VINOLO et al. (2012), que também constataram redução das concentrações séricas de LDL-colesterol em animais tratados com a tributirina (200 mg/ 100 g de p.c.) e dieta hiperlipídica. Além disso, a presente investigação demonstrou que em comparação ao grupo controle o tratamento com a tributirina aumentou a concentração sérica de HDL-colesterol. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de Colesterol total, VLDL-colesterol e Triacilgliceróis entre os dois grupos, como pode ser observado na **Tabela 4**. No entanto, VINOLO et al. (2012) observaram que concentrações séricas de Colesterol total dos animais tratados com a tributirina foram menores quando comparadas às do grupo controle.

Por outro lado, RASO et al. (2013) não observaram qualquer diferença significativa nas concentrações séricas de Colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e triacilgliceróis em animais tratados com tributirina quando comparados aos do grupo controle. Sugere-se que a composição das diferentes rações utilizadas nos estudos relacionados anteriormente, poderia influenciar nos resultados de determinação do perfil lipídico, resultando em alterações no metabolismo lipídico em cada caso experimental.

Apesar de não terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) no peso hepático absoluto e relativo (**Tabela 1**), bem como nas concentrações séricas de Colesterol total e Triacilgliceróis entre os dois grupos experimentais (**Tabela 4**), avaliou-se neste estudo as concentrações hepáticas de Colesterol total e Triacilgliceróis nos animais tratados com a tributirina e nos animais do grupo controle isocalórico. Em comparação ao grupo controle, o tratamento com a tributirina revelou uma redução ($p < 0,05$) na concentração de Colesterol total hepático. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações hepáticas de Triacilgliceróis entre os dois grupos, como pode ser observado na **Tabela 5**.

Por outro lado, em um estudo *in vivo*, HE et al. (2015) observaram a redução significativa das concentrações de triacilgliceróis hepáticos em animais tratados com leite em pó suplementado com 1% de tributirina quando comparado aos animais do grupo controle. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa nas concentrações de Colesterol total hepático entre os grupos. Assim, conclui-se que estes dados contraditórios possam estar relacionados aos diferentes componentes da ração ofertada, bem como às concentrações da tributirina administradas em cada caso experimental.

Os animais tratados com a tributirina apresentaram menores ($p < 0,05$) concentrações hepáticas de MDA quando comparados aos ratos do grupo controle, como pode ser observado na **Figura 16**. Em diversos estudos anteriores, foi constatado em comparação ao grupo controle o aumento nas concentrações séricas de MDA em

pacientes com HCC (TSAI et al., 2009; ZHAO et al., 2011; YAHYA et al., 2013). De modo semelhante, foi observado o aumento das concentrações de MDA em câncer de cólon (LAUSCHKE et al., 2002; SKRZYDIEWSKA et al., 2005), esofágico (INAYAMA et al., 2007) e câncer de laringe (INAYAMA et al., 2007), quando comparadas aos seus *surroundings*. Nesse sentido, conclui-se no presente estudo que a redução nas concentrações hepáticas de MDA em animais tratados com a tributirina, poderia atenuar os efeitos deletérios da peroxidação lipídica em fígado de ratos submetidos ao modelo do RH associado à NAFLD.

Em relação a análise por PAS, embora, o presente estudo não tenha revelado diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre os dois grupos experimentais, o *score* entre os graus de marcação apresentou tendência ($p = 0,07$) a ser maior no Grupo TB quando comparado ao grupo CI, como pode ser observado na **Tabela 6**.

A coloração por PAS é um método de identificação de glicogênio (NORO et al., 2010). A marcação imunoistoquímica é obtida por meio da reação do ácido periódico de Schiff com o glicogênio, resultando em diferentes intensidades de coloração. Nesse sentido, áreas com maior concentração de glicogênio são marcadas com maior intensidade (NORO et al., 2010). Estudos anteriores constataram a afinidade do glicogênio hepático por moléculas de água, sugerindo que o aumento das concentrações hepáticas de glicogênio pode resultar em hipertrofia hepatocelular (MackAY, BERGMAN, 1931; NORO et al., 2010).

Diversos compostos podem aumentar o armazenamento de glicogênio nos hepatócitos, entre eles, o butirato de sódio. Assim, BEAUVIEUX et al (2008) demonstraram que o grupo tratado com butirato de sódio (190 mg/100 g de p.c.) apresentou maior concentração hepática de glicogênio quando comparado ao grupo controle. Dessa forma, sugere-se que na presente investigação o maior *score* de glicogênio apresentado pelo Grupo TB possa estar relacionado a um acúmulo de água no interior dos hepatócitos, principalmente em pLPN, justificando o aumento da área destas LPNs, quando comparado ao Grupo CI.

Em relação à acetilação da histona H3K9, os animais tratados com a tributirina apresentaram maior expressão em nível proteico em comparação aos ratos do grupo controle, como pode ser observado na **Figura 17**. Embora, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre os dois grupos experimentais. De forma semelhante, em estudos anteriores constatou-se que o aumento da expressão da histona H3K9, poderia modular a expressão de diversos genes supressores de tumor (KUROIWA-TRZMIELINA et al, 2009), bem como genes relacionados ao metabolismo lipídico, como o *FGF-21* e o *PPAR- α* (LI et al., 2012). Conclui-se que no presente estudo que à administração da tributirina poderia favorecer o aumento da expressão de diversos

genes supressores da carcinogênese, por meio da inibição da enzima desacetilase de histonas.

Em relação à expressão gênica de FGF-21 (**Figura 19**), o Grupo TB apresentou maior ($p < 0,05$) expressão em comparação a seu grupo controle (Grupo CI). Além disso, esses dados são corroborados por meio da marcação imunoistoquímica de FGF-21 (**Figura 20**), que revelou que os animais tratados com a tributirina apresentaram maior ($p < 0,05$) score desta marcação (**Tabela 7**) quando comparados aos ratos do grupo controle isocalórico.

Em diversos estudos anteriores demonstrou-se que o aumento da expressão de FGF-21 estava relacionado a uma regulação metabólica em resposta a diversos tipos de estresses, como a NAFLD (BADMAN et al. Al., 2007, XU et al., 2009; LIU et al., 2015; FISHER et al., 2014; TANAKA et al., 2015) e a carcinogênese (HUANG et al., 2006; YANG et al., 2013; XU et al. 2015). Descreve-se que, em relação aos fatores responsáveis pelo desenvolvimento da NAFLD, o aumento da expressão de FGF-21 resultou na redução das concentrações hepáticas de ácidos graxos de forma independente da insulina (BADMAN et al. Al., 2007, XU et al., 2009; LIU et al., 2014). Além disso, também se constatou a redução da resistência a insulina em roedores (IGLESIAS et al., 2012) e em primatas (NYGAARD et al., 2014), quando comparados a seus grupos controles. FISHER et al. (2014) também observaram que camundongos C57BL/6 *knockout* para FGF-21 (FGF-21-KO) que receberam, durante 4 semanas, ração deficiente em colina e metionina (MCD) apresentaram maior grau de esteatose, fibrose, inflamação e maior peroxidação lipídica quando comparados aos animais do grupo controle. Por outro lado, os camundongos FGF-21-KO que receberam ração MCD e infusões subcutâneas diárias de FGF-21 demonstraram resultados semelhantes àqueles observados no grupo controle.

Em se tratando do desenvolvimento de lesões neoplásicas, estudos anteriores demonstraram em camundongos tratados com DEN (1 mg/ 100 g de p.c.) um aumento da expressão de FGF-21 quando comparada à dos animais do grupo controle (YANG et al., 2013; XU et al. 2015). Nesse sentido, XU et al. (2015) observaram que o grupo dos animais que foram tratados com FGF-21 (300 mg/ 100 g de p.c.) e DEN (1 mg/ 100 g de p.c.) apresentaram menor incidência de lesões neoplásicas quando comparado aos camundongos do grupo controle. De forma semelhante, animais transgênicos para FGF-21 (+/+) tratados com DEN apresentaram maior tempo de latência quando comparados aos camundongos do grupo controle (HUANG et al., 2006). Nesse sentido, conclui-se no presente estudo que o aumento da expressão de FGF-21 no Grupo TB possa estar relacionado a um mecanismo compensatório, atenuando o estresse carcinogênico e metabólico induzido pelo modelo do RH associado à NAFLD.

A análise de expressão em nível proteico de PPAR- α revelou que o Grupo TB apresentou maior ($p < 0,05$) expressão em comparação ao Grupo CI, como pode ser observado na **Figura 21**. Em estudos anteriores demonstrou-se a relação entre PPAR- α e FGF-21. Assim, descreve-se que as ações de FGF-21 são moduladas pela expressão em nível proteico de PPAR- α (BADMAN et al. Al., 2007; INAGAKI et al, 2007; YANG et al., 2013; KHARITONENKOV, DI MARCHI, 2015). Nos hepatócitos forma-se o complexo proteico PPAR- α -FGF-21, que promove a β -oxidação de ácidos graxos, cetogênese, e a gliconeogênese, em resposta a diversos tipos de estresses metabólicos (BADMAN et al. Al., 2007; INAGALKI et al, 2007). Assim, conclui-se na presente investigação que a formação do complexo PPAR- α -FGF-21 poderia estar relacionada às alterações benéficas observadas no metabolismo lipídico, como a redução nas concentrações séricas de LDL colesterol e aumento no HDL-colesterol, bem como na redução das concentrações hepáticas de Colesterol total dos animais tratados com a tributirina.

6. Conclusão

O presente estudo demonstrou que o tratamento com a tributirina apresentou um efeito quimiopreventivo quando administrada nas etapas de iniciação/promoção inicial em modelo de hepatocarcinogênese associado à NAFLD. Adicionalmente, sugere-se que sua atividade como HDACi poderia modular genes supressores de tumores, bem como aqueles relacionados ao metabolismo lipídico, atenuando os fatores de risco da NAFLD.

7. Referências

ALBERT, A. Chemical aspects of selective toxicity. **Nature**, v. 182, n. 4633, p. 421-2, Aug 16 1958.

ANDRADE, F. O. et al. Efficacy of the dietary histone deacetylase inhibitor butyrate alone or in combination with vitamin A against proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 9, p. 841-850, Sep 2012

ALVARO, A. et al. Gene expression analysis of a human enterocyte cell line reveals downregulation of cholesterol biosynthesis in response to short-chain fatty acids. **IUBMB Life**, v. 60, n. 11, p. 757-64, Nov 2008.

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

ANSTEE, Q. M.; DAY, C. P. The genetics of NAFLD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 11, p. 645-55, Nov 2013.

BADMAN, M. K. et al. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. **Cell Metab**, v. 5, n. 6, p. 426-37, Jun 2007.

BAE, K. H.; KIM, J. G.; PARK, K. G. Transcriptional regulation of fibroblast growth factor 21 expression. **Endocrinol Metab (Seoul)**, v. 29, n. 2, p. 105-11, Jun 2014.

BEAUVIEUX, M. C. et al. Butyrate ingestion improves hepatic glycogen storage in the re-fed rat. **BMC Physiol**, v. 8, n. 19, p. 1-12, Oct 2008.

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

BOFFA, L. C. et al. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. **J Biol Chem**, v. 253, n. 10, p. 3364-6, May 1978.

BOTROS, M.; SIKARIS, K. A. The de Ritis ratio: the test of time. **Clin Biochem Rev**, v. 34, n. 3, p. 117-30, Nov 2013.

BUDIHARDJO, I. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 269-90, 1999.

CANANI, R. B. et al. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 12, p. 1519-28, Mar 28 2011.

CASTRO, R. E. et al. Identification of microRNAs during rat liver regeneration after partial hepatectomy and modulation by ursodeoxycholic acid. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 299, n. 4, p. G887-97, Oct 2010.

CHEN, Z. X.; BREITMAN, T. R. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. **Cancer Res**, v. 54, n. 13, p. 3494-9, Jul 1 1994.

CLARKE, K. O.; FEINMAN, R.; HARRISON, L. E. Tributyrin, an oral butyrate analogue, induces apoptosis through the activation of caspase-3. **Cancer Lett**, v. 171, n. 1, p. 57-65, Sep 28 2001.

CUEVAS-RAMOS, D. et al. The role of fibroblast growth factor 21 (FGF21) on energy balance, glucose and lipid metabolism. **Curr Diabetes Rev**, v. 5, n. 4, p. 216-20, Nov 2009.

DANIEL, P. et al. Pharmacokinetic study of butyric acid administered in vivo as sodium and arginine butyrate salts. **Clin Chim Acta**, v. 181, n. 3, p. 255-63, May 31 1989.

DASARATHY, S. et al. Elevated hepatic fatty acid oxidation, high plasma fibroblast growth factor 21, and fasting bile acids in nonalcoholic steatohepatitis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, n. 5, p. 382-8, May 2011.

DAVIE, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **J Nutr**, v. 133, n. 7 Suppl, p. 2485S-2493S, Jul 2003.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-5, Apr 1998.

DE CONTI, A. et al. Chemopreventive effects of the dietary histone deacetylase inhibitor tributyrin alone or in combination with vitamin A during the promotion phase of rat hepatocarcinogenesis. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 8, p. 860-6, Aug 2012.

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

DI SABATINO, A. et al. Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. **Gastroenterology**, v. 133, n. 1, p. 137-49, Jul 2007.

DOKMANOVIC, M.; CLARKE, C.; MARKS, P. A. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. **Mol Cancer Res**, v. 5, n. 10, p. 981-9, Oct 2007.

DONOHUE, D. R. et al. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. **Mol Cell**, v. 48, n. 4, p. 612-26, Nov 30 2012.

DRUESNE, N. et al. Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 7, p. 1227-36, Jul 2004.

DRUMMOND, D. C. et al. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 495-528, 2005.

EDELMAN, M. J. et al. Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 51, n. 5, p. 439-44, May 2003.

EGORIN, M. J. et al. Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 43, n. 6, p. 445-53, 1999.

ENDO, H. et al. Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63388, 2013.

FARBER, E.; RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. **Cancer Res**, v. 51, n. 11, p. 2751-61, Jun 1 1991.

FARBER, E.; SARMA, D. S. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Lab Invest**, v. 56, n. 1, p. 4-22, Jan 1987.

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. 126-47, Apr 2006.

FISHER, F. M. et al. Fibroblast growth factor 21 limits lipotoxicity by promoting hepatic fatty acid activation in mice on methionine and choline-deficient diets. **Gastroenterology**, v. 147, n. 5, p. 1073-1083, Jul 2006.

FOLEY, J. et al. Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats. **Environ Health Perspect**, v.101, p.199-206, Dec 1993.

GABRIELLI, B. et al. Defining the chemotherapeutic targets of histone deacetylase inhibitors. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 1030, p. 627-35, Dez. 2004.

GAO, Z. et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1509-17, Jul 2009.

GASCHOTT, T. et al. Tributyrin, a stable and rapidly absorbed prodrug of butyric acid, enhances antiproliferative effects of dihydroxycholecalciferol in human colon cancer cells. **J Nutr**, v. 131, n. 6, p. 1839-43, Jun 2001.

GUARIENTO, A. H. et al. Transcriptomic responses provide a new mechanistic basis for the chemopreventive effects of folic acid and tributyrin in rat liver carcinogenesis. **Int J Cancer**, v. 135, n. 1, p. 7-18, Jul 1 2014.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n. 1, p. 420-426, Oct 1978.

HE, J. et al. Dietary Tributyrin Supplementation attenuates insulin resistance and abnormal lipid metabolism in suckling piglets with intrauterine growth retardation. **PLoS One**, v. 10, n. 8, e. 0136848, Aug 2015.

HEBBARD, L.; GEORGE, J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 8, n. 1, p. 35-44, Jan 2011.

HEERDT, B. G. et al. Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a triglyceride analogue of the short-chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity. **Cancer Res**, v. 59, n. 7, p. 1584-91, Apr 1 1999.

HEIDOR, R. et al. Anticarcinogenic actions of tributyrin, a butyric acid prodrug. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 14, p. 1720-9, Dec 2012.

HEIDOR, R. et al. The chemopreventive activity of the histone deacetylase inhibitor tributyrin in colon carcinogenesis involves the induction of apoptosis and reduction of DNA damage. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 276, n. 2, p. 129-35, Apr 2014.

HEIDOR, R. et al. The chemopreventive activity of butyrate-containing structured lipids in experimental rat hepatocarcinogenesis. **Mol Nutr Food Res**, v. 60, n. 2, p. 420-9, Feb 2016.

HOLUBEC, H. et al. Assessment of apoptosis by immunohistochemical markers compared to cellular morphology in ex vivo-stressed colonic mucosa. **J Histochem Cytochem**, v. 53, n. 2, p. 229-35, Feb 2005.

HONG, Y.L. et al. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. **Clin. Biochem.** v.33, p.619-625, Nov 2000.

HUANG, X. et al. Forced expression of hepatocyte-specific fibroblast growth factor 21 delays initiation of chemically induced hepatocarcinogenesis. **Mol Carcinog.** v.45, n. 12 p.934-42, Dec 2006.

IGLESIAS, P. et al. Biological role, clinical significance, and therapeutic possibilities of the recently discovered metabolic hormone fibroblastic growth factor 21. **Eur J Endocrinol**, v. 167, n. 3, p. 301-9, Sep 2012.

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277-88, Apr 2002.

INAGAKI, T. et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. **Cell Metab**, v. 5, n. 6, p. 415-25, Jun 2007.

INAYAMA, M. et al. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and esophageal cancer. **Hepatogastroenterology**, v. 54, n. 75, p. 761-5, Apr-May 2007.

JEONG, J.; ADAMSON, L.K.; HATAM, R.; GREENHALGH, D.G.; CHO, K. Alterations in the expression and modification of histones in the liver after injury. **Exp. Mol. Pathol**, v. 75, n. 3, p. 256-264, Dec 2003.

KÄLSCH, J. et al. I Normal liver enzymes are correlated with severity of metabolic syndrome in a large population based cohort. **Sci Rep**, v. 13, n. 5, p. 1-9, Aug 2015.

KANURI, G.; BERGHEIM, I. In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 6, p. 11963-80, 2013.

KHARITONENKOV, A.; DI MARCHI, R. FGF21 Revolutions: Recent Advances illuminating FGF21 Biology and Medicinal Properties. **Trends Endocrinol Metab**, v. 26, n. 11, p. 608-17, Nov 2015.

KOMATA, T. et al. Histone deacetylase inhibitors, N-butyric acid and trichostatin A, induce caspase-8 but not caspase-9-dependent apoptosis in human malignant glioma cells. **Int J Oncol**, v. 26, n. 5, p. 1345-52, 2005.

KUEFER, R. et al. Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. **Br J Cancer**, v. 90, n. 2, p. 535-41, Jan 26 2004.

KURITA-OCHIAI, T.; OCHIAI, K.; FUKUSHIMA, K. Butyric acid-induced T-cell apoptosis is mediated by caspase-8 and-9 activation in a Fas-independent manner. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 2, p. 325-32, Mar 2001.

KUROIWA-TRZMIELINA, J. et al. Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug. **Int J Cancer**, v. 124, n. 11, p. 2520-7, Jun 1 2009.

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

LAUSCHKE, H. et al. Lipid peroxidation as additional marker in patients with colorectal cancer. Results of a preliminary study. **Eur Surg Res**, v. 34, n. 5, p. 346-50, Oct 2002.

LEFEVER, S. et al. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 7, p. 2065-2069, Apr 2009.

LEVIN, S. et al. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. **Toxicol Pathol**, v. 27, n. 4, p. 484-90, Jul-Aug 1999.

LI, H. et al. Sodium butyrate stimulates expression of fibroblast growth factor 21 in liver by inhibition of histone deacetylase 3. **Diabetes**, v. 61, n. 4, p. 797-806, Apr 2012.

LIU, J. et al. The role of fibroblast growth factor 21 in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease and implications for therapy. **Metabolism**, v. 64, n. 3, p. 380-389, Mar 2015.

LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) **Methods** v.25,n.4, p.402-408, Dec 2001.

LITVAK, D. A. et al. Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate. **Anticancer Res**, v. 20, n. 2A, p. 779-84, Mar-Apr 2000.

LIU, J. et al. The role of fibroblast growth factor 21 in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease and implications for therapy. **Metabolism**, v. 64, n. 3, p. 380-90, Mar 2015.

LONG, Y. C.; ZIERATH, J. R. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1776-83, Jul 2006.

LOOMBA, R.; SANYAL, A. J. The global NAFLD epidemic. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 11, p. 686-90, Nov 2013.

MacKAY, E.; BERGMAN, H. C. The relation between glycogen and water storage in the liver. **J Biol Chem**, v. 96, p. 373-80, Dec 1932.

MAIER, S. et al. Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines. **Int J Cancer**, v. 88, n. 2, p. 245-51, Oct 2000.

MATTACE RASO, G. et al. Effects of sodium butyrate and its synthetic amide derivative on liver inflammation and glucose tolerance in an animal model of steatosis induced by high fat diet. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68626, 2013.

MICHELOTTI, G. A.; MACHADO, M. V.; DIEHL, A. M. NAFLD, NASH and liver cancer. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 11, p. 656-65, Nov 2013.

MORENO, F. S. et al. Inhibitory effects of beta-carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 10, p. 1817-22, Oct 1991.

MUSKHELISHVILI, L. et al. Evaluation of Cell Proliferation in Rat Tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) Immunohistochemistry and In Situ Hybridization for Histone mRNA. **J Histochem Cytochem**, v. 51, n. 12, p. 1681-8, Dec 2003.

NAKAMURA, A. & TERAUCHI, Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 11, p. 21240-57, Oct 2013.

NAKANO, K. et al. Butyrate activates the waf1/cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. **J. Biol. Chem**, v. 272, n. 35, p. 22199-206, Ago. 1997.

NORO, T. et al. Hepatocellular Carcinoma with Foamy Histiocyte-Like Appearance: A Deceptively Clear Cell Carcinoma Appearing Variant. **Case Rep Gastroenterol**, v. 4, n. 2, p. 286-92, Jun 2010.

NOZAL, M. A. et al. HPLC Determination of Low Molecular Weight Organic Acids in Honey with Series- Coupled Ion- Exclusion Columns. **J Liq Chromatogr Relat Technol**, v. 26, p. 1231-53, Jun 2003.

NYGAARD, E. B. et al. Increased fibroblast growth factor 21 expression in high-fat diet-sensitive non-human primates (*Macaca mulatta*). **Int J Obes (Lond)**, v. 38, n. 2, p. 183-91, Feb 2014.

ONG, T. P. et al. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis with dietary isoprenic derivatives: cellular and molecular aspects. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 12, n. 9, p. 1173-90, Nov 1 2012.

ORTEGA, J. F. et al. Suppressing activity of tributyrin on hepatocarcinogenesis is associated with inhibiting the p53-CRM1 interaction and changing the cellular compartmentalization of p53 protein. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 24339-47, Apr 2016.

PANTSARI, M. W.; HARRISON, S. A. Nonalcoholic fatty liver disease presenting with an isolated elevated alkaline phosphatase. **J Clin Gastroenterol**, v. 40, n. 7, p. 633-5, Aug 2006.

PARODI, P. W. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. **J Nutr**, v. 127, n. 6, p. 1055-60, Jun 1997.

PITOT, H. C. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 859-60, Sep 15 2001.

RASO, M. G. et al. Effects of sodium butyrate and its synthetic amide derivative on liver inflammation and glucose tolerance in an animal model of steatosis induced by high fat diet. **PLoS One**, v. 8, n. 7, e. 68626, Jul 2003.

RIGGS, M. G. et al. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. **Nature**, v. 268, n. 5619, p. 462-4, Aug 4 1977.

RINELLA, M. E. et al. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. **J Lipid Res**, v. 49, n. 5, p. 1068-1076, May 2008.

RIZZI, M. B. et al. beta-carotene inhibits persistent and stimulates remodeling gamma GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 67, n. 6, p. 415-22, 1997.

ROGLER, G. et al. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. **Gastroenterology**, v. 115, n. 2, p. 357-69, Aug 1998.

RUEMMELE, F. M. et al. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 94-100, Jan 2003.

SAITO, H. et al.. Loss of butyrate-induced apoptosis in human hepatoma cell lines HCC-M and HCC-T having substantial bcl-2 expression. **Hepatology**, v. 27, n. 5, p. 1233-40, May 1998.

SANTOS-ROSA, H.; CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 16, p. 2381-402, Nov 2005.

SAWAKI, M. et al. Chronic liver injury promotes hepatocarcinogenesis of the LEC rat. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 331-5, Feb 1998.

SCHEPPACH, W. et al. Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 16, n. 1, p. 43-8, Jan-Feb 1992.

SCHRÖDER, C. P.; MAURER, H. R. Tributyrin-induced differentiation promotes apoptosis of LS 174T colon cancer cells in vitro. **Int J Oncol**, v. 20, n. 1, p. 195-200, Jan 2002.

SCOLASTICI, C. et al. beta-ionone inhibits persistent preneoplastic lesions during the early promotion phase of rat hepatocarcinogenesis: TGF-alpha, NF-kappaB, and p53 as cellular targets. **Nutr Cancer**, v. 66, n. 2, p. 234-41, 2014.

SEGAIN, J. P. et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. **Gut**, v. 47, n. 3, p. 397-403, Sep 2000.

SEMPLE-ROBERTS, E. et al. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **Int J Cancer**, v. 40, n. 5, p. 643-5, Nov 15 1987.

SHIN, S. Y. et al. 2'-Hydroxyflavanone induces apoptosis through Egr-1 involving expression of Bax, p21, and NAG-1 in colon cancer cells. **Mol Nutr Food Res**, v. 56, n. 5, p. 761-74, May 2012.

SKRZYDLEWSKA, E. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 3, p. 403-6, Jan 2005.

SINGH, S. et al. Chemopreventive strategies in hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 1, p. 45-54, Jan 2013.

SOLT, D.; FARBER, E. New principles for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p. 701-703, Nov 12 1976.

SPORN, M. B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. **Cancer Res**, v. 36, n. 7 PT 2, p. 2699-702, Jul 1976.

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

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

TAKAHASHI, Y.; SOEJIMA, Y.; FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/ nonalcoholic steatohepatitis. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 19, p. 2300-2308, May 2012.

TAKAKI, A.; KAWAI, D.; YAMAMOTO, K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 10, p. 20704-28, 2013.

TANAKA, N. et al. Role of fibroblast growth factor 21 in the early stage of NASH induced by methionine and choline-deficient diet. **Biochim Biophys Acta**, v. 1852, n. 7, p. 1242-52, 2015.

TIAN, Y. et al. Epigenetic regulation of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease. **Semin Cancer Biol**, v. 23, n. 6 Pt B, p. 471-82, Dec 2013.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836-46, Nov 2010.

TSAI, S. M. et al. Evaluation of redox statuses in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. **Ann Clin Biochem**, v. 46, n. 5, p. 394-400, Sep 2009.

UMAR, A., DUNN, B.K., GREENWALD, P. Future directions in cancer prevention. **Nat. Rev. Cancer**, v12, n. 12, p. 835–848, Dec 2012.

VECCHIA, M. G. et al. Acetate and propionate potentiate the antiproliferative effect of butyrate on RBL-2H3 growth. **Gen Pharmac**, v. 29, n. 5, p. 723-28, Nov 1997.

VINOLO, M. A. et al. Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303, n. 2, p. E272-82, Jul 15 2012.

WALKER, G. E. et al. Butyrate, a histone deacetylase inhibitor, activates the human IGF binding protein-3 promoter in breast cancer cells: molecular mechanism involves an Sp1/Sp3 multiprotein complex. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 3817-27, Sep 2001.

WATKINS, S. M. et al. Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumour cells. **J Dairy Res**, v. 66, n. 4, p. 559-67, Nov 1999.

WILLIAMS, E. A.; COXHEAD, J. M.; MATHERS, J. C. Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. **Proc Nutr Soc**, v. 62, n. 1, p. 107-15, Feb 2003.

WILSON, N. H.; HARDISTY, J. F.; HAYES, J. R. Principles and methods of toxicology. **Informa Healthcare**, p. 1223-1264, 2008.

WITT, O. et al. Tumor cell differentiation by butyrate and environmental stress. **Cancer Lett**, v. 171, n. 2, p. 173-82, Oct 10 2001.

WU, B. et al. Dietary corn oil promotes colon cancer by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis in azoxymethane-treated rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 229, n. 10, p. 1017-25, Nov 2004.

XU, J. et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. **Diabetes**, v. 58, n. 1, p. 250-9, Jan 2009.

XU, P. et al. Long-Term administration of Fibroblast Growth Factor 21 prevents chemically-Induced hepatocarcinogenesis in Mice. **Dig Dis Sci**, v. 60, n. 10, p. 3032-43, Oct 2015.

YAHYA, R. S. et al. Role of interleukin-8 and oxidative stress in patients with hepatocellular carcinoma. **Clin Lab**, v. 59, n. 9-10, p. 969-76, Jun. 2013.

YAMAMOTO, H. et al. Suppression of growth of hepatocellular carcinoma by sodium butyrate *in vitro* and *in vivo*. **Int. J. Cancer**, v. 76, n. 6, p. 897-902, Jun. 1998.

YANG, C. et al. Activation of Liver FGF21 in hepatocarcinogenesis and during hepatic stress. **BMC Gastroenterol**, v. 13, p. 67, 2013.

ZHANG, Y. et al. The link between fibroblast growth factor 21 and sterol regulatory element binding protein 1c during lipogenesis in hepatocytes. **Mol Cell Endocrinol**, v. 342, n. 1-2, p. 41-7, Dec 14 2011.

ZHAO, J. et al. Association between metabolic abnormalities and HBV related hepatocellular carcinoma in Chinese: A cross-sectional study. **Nutr J**, v. 10, n. 49, p. 1-8, May 2011.

ZHOU, D. et al. Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. **World J Gastroenterol**, v. 23, n. 1, p. 60-75, Jan 2017.

ZOU, Y. et al. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. **Life Sci**, v. 79, n. 11, p. 1100-7, Aug 8 2006.

8. Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 77.2014-P462

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa **“Efeito quimiopreventivo da Tributirina na fase de iniciação / promoção inicial da hepatocarcinogênese, associada ou não ao desenvolvimento de esteatoepatite não alcoólica em ratos Wistar”** (Protocolo CEUA/FCF/462), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Roberto Carvalho Yamamoto**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **09 de maio de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 13 de agosto de 2014.

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

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9132 - 9063268/1 - Roberto Carvalho Yamamoto

Email: roberto.yamamoto@usp.br
Data de Nascimento: 11/10/1984
Cédula de Identidade: RG - 33.156.171-2 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Farmácia - Universidade Municipal de São Caetano do Sul - São Paulo - Brasil - 2008

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 02/04/2014
Início da Contagem de Prazo: 02/04/2014
Data Limite para o Depósito: 30/01/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Fernando Salvador Moreno - 02/04/2014 até o presente. Email: rmoreno@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 02/04/2014
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 02/10/2016 até 30/01/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 30/06/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 28/09/2016

Impresso em: 30/01/2017 10:17:20

9132 - 9063268/1 - Roberto Carvalho Yamamoto

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5712-6/1	Fisiologia da Nutrição I	19/05/2014	29/06/2014	90	6	100	A	N	Concluída
VPT5781-1/2	Hepatologia Experimental e Comparada (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	22/09/2014	26/10/2014	90	6	90	A	N	Concluída
QBQ5747-8/1	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/11/2014	30/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
FBA5897-2/2	Nutrigenômica do Câncer	03/08/2015	09/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
MAG5002-1/1	Genética Molecular Humana e Genômica (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	14/08/2015	26/11/2015	120	8	86	A	N	Concluída
MCM5851-4/3	Adesão Celular e Câncer (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	07/10/2015	08/12/2015	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 28/09/2016

Impresso em: 30/01/2017 10:17:21

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9132 - 9063268/1 - Roberto Carvalho Yamamoto

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
90502	Fernando Salvador Moreno	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Prorrogação em 28/09/2016

Impresso em: 30/01/2017 10:17:21