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

Atividade quimiopreventiva da tributirina e do ácido fólico quando administrados isoladamente e/ou em associação na etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos Wistar

Aline Henriques

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2013

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

Atividade quimiopreventiva da tributirina e do ácido fólico quando administrados isoladamente e/ou em associação na etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos Wistar

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Aline Henriques

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2013

Aline Henriques

Atividade quimiopreventiva da tributirina e do ácido fólico quando administrados isoladamente e/ou em associação na etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos Wistar

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, março de 2013.

“Aprender é a única coisa de que
a mente nunca se cansa, nunca
tem medo e nunca se arrepende”
(Leonardo Da Vinci)

Aos meus pais Cristina e Mauro com todo amor.

A vocês, dedico.

Agradecimentos

Primeiramente, aquele que me deu a vida, Deus, o qual me acompanhou durante toda a jornada, me dando força e saúde para enfrentar todas as dificuldades. Agradeço por iluminar o meu caminho a cada dia.

Um agradecimento especial ao Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno, excelente docente e verdadeiro amante da pesquisa. Professor que me ensinou que em pesquisa mais choramos do que rimos, e isso torna cada vez mais viciante essa arte da busca pelas respostas de tantas e tantas perguntas. Foi com ele que aprendi que antes de qualquer coisa é necessário estudar, e estudar muito. Agradeço por todos os ensinamentos e pelo estímulo e exigência crescente que me fizeram descobrir e me apaixonar pelo maravilhoso mundo da pesquisa.

À minha mãe que batalhou muito para me fornecer a oportunidade de alcançar muitos sonhos. Sem ela nada disso se tornaria uma realidade. Exemplo de perseverança, responsabilidade e coragem.

Ao meu pai, que mesmo distante, pode me apoiar nas horas difíceis.

Ao meu noivo, David, por todo apoio, carinho, atenção e dedicação durante mais essa etapa. Agradeço por me fazer mais feliz a cada dia. Obrigada por me apresentar a Juvencar.

Agradeço a toda minha família: Andressa, Dirceu e Vilma por ser minha base.

Agradeço ao Fiore e a Lana pelo exemplo. Os admiro muito e é muito bom saber que em vocês sempre encontrarei um porto seguro, mesmo não sendo filha. Obrigada pelos momentos de alegria, risadas, descontração e por todo o apoio e coragem que me deram durante essa etapa. Obrigada por me apresentarem a Juvencar.

Agradeço a Juvencar por me proporcionar tantas reflexões sobre religião, caráter, amizade, e permitir que eu cresça a cada dia. Vocês são essenciais. Obrigada por me mostrar como é bom ser católico.

Ao Prof. Dr. Thomas Prates Ong, quem considero um grande e admirável pesquisador, pela sua vocação acadêmica. Agradeço por todo o apoio e por todos os ensinamentos e filosofias.

A Profa. Ana Beatriz Ramos de Oliveira Pinn pela confiança e por ter me aberto as portas para o mundo da pesquisa.

A amiga Kelly Silva Furtado por todo o apoio durante esses dois anos. Agradeço por toda a dedicação, por todas as críticas construtivas, por todas as correções e por ter

realizado um verdadeiro trabalho de mãe. A quem eu tenho grande admiração não apenas pela capacidade intelectual, mas também pelo caráter e exemplo de pessoa.

Agradeço a todos do laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer: Renato, por todo auxílio na condução deste trabalho e pelos momentos de descontração essenciais ao bom andamento dessa dissertação; Adriana, por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho e pelos momentos de alegria; Mayara, por ser minha mão direita e esquerda, Juliana, por toda colaboração; Eduardo e Laura, por toda ajuda no Western e por exercerem, de maneira ideal, a arte de serem estagiários.

Agradeço as alunas do Prof. Dr. Thomas Prates Ong, Mariana, Fábia, Camille, Luiza, Raquel e Vanessa, por todo o apoio e auxílio nas técnicas laboratoriais, e por me conceder o privilégio de compartilhar da alegria que é trabalhar com vocês.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Chagas, em memória, pelo trabalho realizado com o ácido fólico na fase de iniciação, seleção/promoção da hepatocarcinogênese, o qual foi a minha base para realização desse trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Igor Pogribny e a Dra Aline de Conti do *National Center for Toxicological Research*, da *Division of Biochemical Toxicology*, Jefferson, Arkansas pela colaboração a este trabalho.

À Profa. Dra.*Elvira Maria Guerra* Shinohara e a Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da USP, e ao Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, bem como ao Prof. Dr. Rafael Deminice, do Departamento de Educação Física da Universidade Estadual de Londrina pela colaboração a este trabalho.

Aos demais professores e colegas do departamento, que sempre me ajudaram e me deram suporte ao longo desta jornada. Aos funcionários: Lurdinha, por tentar manter a ordem no laboratório, e Joana, por cuidarem do departamento e pelos deliciosos cafés.

Ainda aos excelentes profissionais Cléo, Edilson, Mônica e Roberta, do B14, que jamais exitaram em ajudar e a Elaine e Jorge, da seção de pós, pela paciência e bom-humor que sempre me atenderam.

Aos funcionários do biotério, pelos cuidados despendidos com os animais e pelo suporte que me foi dado nesta etapa tão importante.

À agência de fomento, CNPq, pela concessão da minha bolsa e a FAPESP pelo suporte financeiro ao laboratório, sem os quais não seria possível completar essa jornada.

Resumo

Henriques, A. **Atividade quimiopreventiva da tributirina e do ácido fólico quando administrados isoladamente e/ou em associação na etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos Wistar.** 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O carcinoma hepatocelular (HCC) é a 3ª causa de morte por neoplasias no mundo, sendo também o 5º tipo de neoplasia mais frequente. Seu tratamento limitado juntamente com o mau prognóstico tornam importante a adoção de medidas preventivas. A prevenção das etapas iniciais da hepatocarcinogênese pela administração de compostos bioativos de alimentos (CBAs) atualmente vem sendo observada em diversos estudos. Sugere-se que o processo de carcinogênese envolva alterações genéticas e epigenéticas, como a hipometilação do DNA e a desacetilação de histonas. Nesse sentido, o tratamento com ácido fólico (AF), precursor indireto de grupamento metil, e tributirina (TB), inibidora de enzimas desacetilases de histonas, quando em associação, poderia agir em adição potencializando os efeitos quimiopreventivos dos mesmos comparados às suas ações isoladas. A eventual atividade quimiopreventiva da TB (100mg/100g de peso corpóreo), do AF (0,08mg/100g de peso corpóreo), ambos com a metade da dose utilizada na literatura, e da associação entre os mesmos (AS) foi analisada durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo do hepatócito resistente (HR). Para avaliação de GST-P, da proliferação celular, da apoptose, bem como a localização da histona H3K9 foi utilizada a técnica de imunohistoquímica; para a quantificação de H3K9, western blot. Em relação à análise macroscópica, os grupos tratados apresentaram menor número de nódulos em relação a MD (sem significância estatística), além de menor porcentagem de LPN menores do que 1mm nos grupos TB e AS. Na análise microscópica foi observado que os grupos TB, AF e AS apresentaram menor número de lesões pré neoplásicas persistentes (pLPN) em relação ao grupo controle isocalórico (MD, maltodextrina), assim como menor porcentagem de área ocupada por pLPN e por lesões em remodelação (rLPN). Quanto a proliferação celular, os grupos AF e AS apresentaram menor número de núcleos em fase S/mm^2 quando comparados aos grupos MD e TB. Em relação à apoptose, os grupos TB e AS apresentaram maior número de hepatócitos em apoptose e corpúsculos apoptóticos/mm^2 quando comparados aos grupos MD e AF. No resultado da metilação global do DNA não houve diferença entre os grupos. Em adição, os grupos AF e AS apresentaram maiores concentrações séricas de folato; o mesmo não ocorrendo para B12. No que diz respeito à acetilação de H3K9, os grupos TB e AS apresentaram maior porcentagem de acetilação quando comparados aos grupos N, MD e AF. Em conclusão, os grupos tratados com TB, AF e a associação entre eles apresentaram quimioprevenção pronunciada, sendo que o grupo AS apresentou mecanismos aditivos dos tratamentos isolados.

Palavras chave: Hepatocarcinogênese. Quimioprevenção. Epigenética. Tributirina. Ácido Fólico.

Abstract

Henriques, A.**Chemopreventive effect of tributyrin and folic acid when administered isolated and / or in association in promotion of hepatocarcinogenesis in rats.**2013. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The hepatocellular carcinoma (HCC) is the third leading cause of death by cancer in the world, and the fifth most frequent type of neoplasm. Its limited treatment along with poor prognosis make it important to adopt preventive measures. The prevention of the initial stages of hepatocarcinogenesis by the administration of bioactive food compounds (BFCs) is currently being observed in several studies. It is suggested that the process of carcinogenesis involves genetic and epigenetic modifications, such as DNA hypomethylation and deacetylation of histones. Accordingly, treatment with folic acid (FA), indirect precursor of methyl grouping, and tributyrin (TB), a histone deacetylases inhibiting enzyme, when associated could act in addition to enhance the chemopreventive effects compared to their isolated actions. The possible chemopreventive activity of TB (100mg/100g body weight), FA (0.08 mg/100 g body weight) and the association between them (AS) were studied during the promotion stage of hepatocarcinogenesis in Wistar rats submitted to resistant hepatocyte model (RH).For evaluation of GST-P, cell proliferation, apoptosis, and the location of histone H3K9 was used immunohistochemistry, to quantify H3K9, western blot. Regarding themacroscopic analysis, the treated groupsshowed a lowernumber ofnodulescompared toMD(not statistically significant), and a lower percentagesmaller than1mmin groupsTBandAS. Under microscopic examination the groups TB, FA and AS showed a lower number of persistent pre-neoplastic lesions (pLPN) compared to the isocaloric control group (MD, maltodextrin), as well as a lower percentage of the area occupied by pLPN and remodeling lesions (rLPN). As cell proliferation, FA and AS groups had fewer S phase nuclei/mm² compared to MD and TB groups. Regarding apoptosis, TB and AS groups showed higher numbers of hepatocytes in apoptosis and apoptotic corpuscles/mm² compared to MD and FA groups. Global DNA methylation did not differ between groups. In addition, AF and AS groups had higher serum concentrations of folate, which did not occur for B12.Concerning the H3K9 acetylation, the groups TB and AS showed higher percentage of acetylation when compared with the groups N, MD and FA. In conclusion, the groups treated with TB, FA and the association of both showed pronounced chemoprevention, and the AS group showed additive mechanisms compared with isolated treatments.

Key words: Hepatocarcinogenesis. Chemoprevention.Epigenetics.Tributyrin. Folic Acid

Lista de Figuras

Figura 1	Representação esquemática da estrutura das histonas no nucleossomo. **a.**Histonas H2A, H2B, H3 e H4 enroladas pelo DNA para formar o nucleossomo. Observar a região amino-terminal em vermelho. **b.**Mapa de algumas modificações das histonas. Resíduos de lisina (K) da H2A, H2B, H3 e H4 são sítios potenciais para a ação das HAT/HDAC. A = acetilação; C = região carboxi-terminal; E = ácido glutâmico; M = metilação; N = região amino-terminal; P = fosforilação; S = resíduo de serina; Ub = ubiquitinação. Adaptado de MARKS et al, 2001.	22
Figura 2	Esquema da hidrólise de uma molécula de TB pela lipase pancreática para dar origem a três moléculas de AB.	30
Figura 3	Visão geral do metabolismo dos grupamentos metil. *Diet*, alimentação; *folato*, ácido fólico; *THF*, tetrahidrofolato; *5,10-methylene THR*, 5,10-metilenotetrahidrofolato; *B6*, vitamina B6; *10-formyl-THF*, 10-formil-tetrahidrofolato; *MTHFR*, metileno-tetrahidro-folato-redutase; *5-methyl THF*, 5-metil-tetrahidrofolato; *purine synthesis*, síntese de purina; *dUMP*, desoxiutidilato; *pyrimidine synthesis*, síntese de pirimidina; *TS*, timidalato sintase; *dTMP*, desoxitimidalato; *DNA synthesis*, síntese de DNA; *B12*, vitamina B12; *MS*, metionina sintase; *methionine*, metionina; *homocysteine*, homocisteína; *cystatione*, cistationa; *SAM*, S-adenosil-metionina; *SAH*, S-Adenosilhomocisteína; *DNMTs*, DNA metil-transferases; *CH3*, grupamento metil; *CpG*, ilhas CpG; *DNA methylation*, metilação do DNA; *methylation of other bioactive molecules such as histone, lipids and RNA*, metilação de outras moléculas bioativas como histonas, lipídios e RNA. Figura retirada de Lamprecht e Lipkin (2003).	31
Figura 4	Representação esquemática do protocolo experimental.	39
Figura 5	Evolução do peso de ratos Wistar NT ou tratados com MD, AF, TB e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"; NT = não tratado; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF = ácido fólico; S (TB+AF) = associação; DEN = dietilnitrosamina; 2-AAF = 2-acetilaminofluoreno; HP = hepatectomia parcial a 70%.	48
Figura 6	Consumo de ração de ratos Wistar NT ou tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito	49

Resistente"; NT = não tratado; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF = ácido fólico; AS (TB+AF) = associação; DEN = dietilnitrosamina; 2-AAF = 2-acetilaminofluoreno; HP = hepatectomia parcial a 70%.

Figura 7 Imagens representativas de A e B – marcação imunoistoquímica para GST-P, grupos MD e AF, respectivamente, cabeça de seta corresponde a pLPN e seta a rLPN (objetiva de 10x). 51

Figura 8 Imagens representativas de A e B – núcleos PCNA positivos (fase S), do grupo MD, dentro de pLPN (cabeça de seta) e *surrounding* (seta) (objetiva de 20x e 40x, respectivamente). 52

Figura 9 Quantificação de células marcadas para PCNA (fase S) (n^o/mm^2) de área de *surrounding*, pLPN e rLPN de fígado de ratos Wistar tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF = ácido fólico; AS (TB+AF) = associação; [a,b]diferença em relação ao grupo MD e TB, respectivamente ($p<0,01$), segundo o teste ANOVA pós-teste Tukey. 53

Figura 10 Imagem representativa de apoptose (cabeça de seta), do grupo AS, corado por H&E (objetiva 100x). 54

Figura 11 Quantificação de hepatócitos em apoptose e corpúsculos apoptóticos (n^o/mm^2) por área de *surrounding*, pLPN e rLPN de fígado de ratos Wistar tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"; MD = maltodextrin (controle); TB = tributirina; AF = ácido fólico; AS (TB+AF) = associação; [a]diferença em relação ao grupo MD ($p<0,01$), segundo o teste de Kruskal-Wallis pós-teste Dunn. 54

Figura 12 Quantificação das concentrações hepáticas de ácido butírico em ratos Wistar "NT" e tratados com MD, TB, AF e AS. "NT" = "não tratado"; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF = ácido fólico; AS (AF+TB) = associação; [a] diferença em relação ao grupo N ($p<0,001$); [b] diferença em relação ao grupo MD($p<0,001$); [c] diferença em relação ao grupo AF ($p<0,001$), segundo o teste Kruskal-Wallis pós-teste Dunn. 54

Figura 13 Quantificação das concentrações séricas de folato de ratos Wistar NT e tratados com MD, TB, AF e AS, 55

durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”; NT = não tratado; MD = maltodextrina; TB = tributirina; AF = ácido fólico; AS (TB+AF) = associação; [a,b]diferença em relação ao grupo MD e TB, respectivamente (p<0,001), segundo o teste ANOVA pós-teste Tukey.

Figura 14 Quantificação das concentrações séricas de B12 de ratos Wistar NT e tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”; NT = não tratado; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF – ácido fólico; AS (TB+AF) = associação. 56

Figura 15 Quantificação da metilação global de DNA e tecido hepático total de ratos Wistar NT e tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”; NT = não tratado; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF – ácido fólico; AS (TB+AF) = associação. 56

Figura 16 Western blot das proteínas H3K9 acetilada e H1. (A) Imagem representativa de western blot das proteínas H3K9ac e H1 realizado com proteína hepática do fígado de ratos dos grupos NT, MD, AF, TB e AS. (B) Quantificação da porcentagem de acetilação de H3K9 de ratos Wistar NT e tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”; NT = não tratado; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF – ácido fólico; AS (TB+AF) = associação. [a,b,c]diferença em relação ao grupo NT, MD e AF, respectivamente (p<0,001), segundo o teste de Kruskal-Wallis pós-teste Dunn. 57

Figura 17 Imagem representativa de marcação imunoistoquímica para H3K9 acetilada no citoplasma de pLPN (objetiva 20x). 58

Figura 18 Porcentagem de marcação de acetilação de H3K9 no citoplasma de ratos tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF – ácido fólico; AS (TB+AF) = associação. [a]diferença em relação ao grupo MD, (p<0,002), segundo o teste exato de Fisher. 58

Lista de Tabelas

Tabela 1	Valores garantidos pelo fabricante por quilograma de ração	36
Tabela 2	Quantidades adicionadas pelo fabricante por quilograma de ração	36
Tabela 3	Ganho de peso, peso corpóreo final e peso hepático relativo de ratos Wistar NT ou tratados com TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente".	49
Tabela 4	Incidência, número médio e porcentagem de nódulos visíveis à macroscopia dos fígados de ratos Wistar tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente".	50
Tabela 5	Número, área e porcentagem de LPN em cortes histológicos de fígado de ratos Wistar tratados com MD, TB, AF ou AS, durante a etapa de promoção de hepatocarcinogênese pelo modelo do "Hepatócito Resistente"	51

Lista de Abreviaturas e Siglas

2-AAF = 2-acetilaminofluoreno
AB = ácido butírico
AF = ácido fólico
AS = associação
CA = corpúsculo apoptótico
CDKs = quinases dependentes de ciclina
CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DEN = dietilnitrosamina
DNMT = DNA metiltransferase
GST-P = glutationa-S-transferase, forma placentária
H3K9 = resíduo de lisina 9 da histona 3
H&E = hematoxilina e eosina
HAT = acetilases de histonas
HBV = vírus da hepatite B
HCC = hepatocarinoma celular
HCV = vírus da hepatite C
HDAC = desacetilases de histonas
HDACI = inibidor da desacetilase de histonas
HP = hepatectomia parcial
HR = hepatócito resistente
LPN = lesão pré-neoplásica
pLPN = lesão pré-neoplásica persistente
rLPN = lesão pré-neoplásica em remodelação
MD = maltodextrina
PBS = solução salina tamponada com fosfato
PCNA = antígeno nuclear de proliferação celular
SAM = S-adenosil-L-metionina
SAH = S-adenosil-L-homocisteína
TB = tributirina

Sumário

1. Revisão da Literatura 17

1.1 Aspectos Epidemiológicos do Câncer 17

1.2 Carcinogênese 17

1.2.1 Metilação do DNA 19

1.2.2 Acetilação de Histonas 20

1.3 O Modelo de Carcinogênese do Hepatócito Resistente (HR) 22

1.4 Relação Dieta, Nutrição e Câncer 25

1.5 Quimioprevenção 26

1.6 Tributirina (TB) e Quimioprevenção 27

1.7 Ácido Fólico (AF) e Quimioprevenção 30

2. Objetivos 35

3. Material e Métodos 35

3.1 Animais 35

3.2 Modelo de Hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente" 37

3.3 Protocolo Experimental 37

3.4 Eutanásia dos Animais 39

3.5 Exame Macroscópico dos Fígados 40

3.6 Dupla Marcação Imunoistoquímica 40

3.7 Imunoistoquímica para H3K9 41

3.8 Procedimento para quantificação de LPN GST-P Positivas 42

3.9 Quantificação da Proliferação celular 42

3.10 Quantificação da Apoptose 42

3.11 Determinação da Concentração Hepática de Ácido Butírico 42

3.12 Determinação de Folato e Cobalamina Séricos 43

3.13 Determinação da Metilação Global de DNA 43

3.13.1 Extração de DNA 43

3.13.2 Hidrólise do DNA 44

3.13.2.1 Técnica de CLAE 45

3.13.2.2 Solução Padrão 45

3.13.2.3 Sistema Analítico 45

3.14 Avaliação da Acetilação no Resíduo de Lisina 9 da Histona 3 (H3K9) 46

3.14.1 Extração Ácida de Histonas 46

3.14.2 Western Blot de H3K9 Acetilada 46

3.15 Análise Estatística 47

4. Resultados..... 48

4.1 Dados Gerais 48

4.2 Avaliação de Proliferação Celular e Apoptose 52

4.3 Quantificação Hepática de Ácido Butírico.....54

4.4 Análise de Folato e B12..... 55

4.5 Metilação Global do DNA..... 56

4.6 Avaliaçãopor Western Blot de H3K9 Acetilada 57

4.7 Marcação Imunoistoquímica de H3K9 Acetilada 57

5. Discussão 59

6. Conclusões..... 64

7. Referências Bibliográficas 65

Anexo I 86

1. Revisão da Literatura

1.1 Aspectos Epidemiológicos de Neoplasias

As neoplasias malignas, popularmente conhecidas como cânceres, representam a principal causa de mortalidade no mundo, contabilizando cerca de 7,6 milhões de mortes (em torno de 13% do total de mortes) (OMS, 2006; OMS, 2012; IARC, 2012.). Se não forem tomadas medidas em longo prazo e amplo alcance, haverá 26 milhões de casos novos e 17 milhões de mortes por ano no mundo em 2030 (THUN, 2010; INCA, 2012.), sendo que 2/3 das vítimas ocorrerão nos países em desenvolvimento (THUN, 2010).

Dentre as neoplasias mais comuns mundialmente está o carcinoma hepatocelular (HCC); é o 5º mais frequente e a 3ª causa mais comum de mortalidade por esta doença, além de apresentar mau prognóstico e reduzido índice de sobrevida (EL-SERAG, RUDOLPH, 2007; MOTET, CASTRONOVO, 2008; OMS, 2012). No Brasil, o HCC ocupa a 9ª posição em mortalidade e, aproximadamente, ocorrem 9000 casos novos e 8900 mortes anualmente pelo mesmo (FERLAY, 2010; INCA 2012).

Dentre os fatores de risco associados ao desenvolvimento do HCC podemos classifica-los em agentes físicos, químicos e biológicos, dentre eles: os vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV); a ingestão crônica de etanol, o uso de tabaco, o consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas, esteatohepatite não alcoólica e o uso de contraceptivos orais (YU, YUAN, 2004; MARRERO, 2005; BOSCH et al, 2005; MOTET, CASTRONOVO, 2008).

1.2 Carcinogênese

O câncer é um conjunto de doenças que consistem em alterações celulares de diferentes origens (GREAVES, 2002), com expressão gênica alterada, proliferação celular desordenada e invasão de outros tecidos, o que compromete as funções normais da célula [(FENECH, 2002; LLOVET, BURROUGHS, BRUIX, 2003). Deste modo, descreve-se a existência de mais de 100 tipos de neoplasias, que podem ser classificadas em benignas ou malignas de acordo com determinadas características. Assim, as neoplasias benignas apresentam células semelhantes às do tecido de origem (bem diferenciadas) e não há alteração nuclear, porém ocorre formação de arranjo tecidual diferente do original. Por outro lado, as neoplasias malignas apresentam células com

alterações no núcleo, em sua forma, tamanho e número, além de mitoses atípicas, alteração na relação núcleo/citoplasma e capacidade de invasão (HANAHAN, WEINBERG, 2000; GREAVES, 2002; KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005).

Carcinogênese é um termo geral utilizado para se denotar o desenvolvimento de neoplasias (PITOT, 2007). Diversas evidências indicam que este é um processo em múltiplas etapas que refletem alterações genéticas e epigenéticas, direcionando a transformação de células normais em malignas (HANAHAN, WEINBERG, 2000). Este é um processo longo que necessita de cerca de metade a 2/3 da vida das diferentes espécies (FARBER, 1990), ou de 20 a 40 anos, especialmente no caso de neoplasias sólidas em humanos (FRANKS, KNOWLES, 2005).

É bastante discutível o número exato de etapas que compõe a carcinogênese, existindo evidências de que a neoplasia ocorra em três estágios básicos cada um com características morfológicas e moleculares distintas. Estes estágios são denominados iniciação, promoção e progressão (PITOT, 2011; EIS, 2005). Na iniciação é necessário que haja uma mutação, a qual deve ser causada por agentes de natureza física (ex: radiação ionizante), química (ex: quimioterapia) ou biológica (ex: HBV) (YOUNG, YANG, COLBURN, 2003). Estes agentes provocam a quebra do DNA, que após um ciclo de proliferação celular é fixada, sendo este um estágio irreversível (FARBER, SARMA, 1987; PITOT, 2011). A etapa seguinte, denominada promoção, é caracterizada pela expansão clonal das células iniciadas na presença contínua de um agente promotor de fonte endógena ou exógena, o que a torna uma fase reversível (nessa fase os cancinógenos tambem podem atuar por mecanismos não-genotóxicos) (LUCH, 2005). O último estágio da carcinogênese é a progressão, caracterizada por ser irreversível, pela instabilidade cariotípica, contínua evolução de modificações bioquímicas nas células malignas, aumento da proliferação celular, invasão e desenvolvimento de metástases (PITOT, 2011; HANAHAN, WEINBERG, 2011).

Agentes que causam danos ao DNA atuam por mecanismos genotóxicos, mutagênicos, oxidação de bases ou erros no processo de reparo do DNA que podem levar a mutações em genes específicos, como por exemplo, proto-oncogenes e genes supressores de tumor (WATSON, CAI, JONES, 2000; WEISBURGER, 2001). Essas mutações, caso não eliminadas pelo sistema de reparo do DNA, podem originar rearranjos cromossômicos, substituições, inversões ou deleções de bases (PITOT, 2011).

Além dos eventos genéticos, estudos demostraram que alterações epigenéticas estão geralmente envolvidas no desenvolvimento de neoplasias (WORM, GULDBERG, 2002; JONES, BAYLIN, 2007). Essas podem ser definidas como alterações estáveis, reversíveis e potencialmente herdáveis na expressão gênica que não afetam a sequência de nucleotídeos do DNA (JIANG, BRESSLER, BEAUDET, 2004) tais como a metilação do DNA e modificações em histonas (ESTELLER, ALMOUZNI, 2005).

1.2.1 Metilação do DNA

A principal modificação epigenética do genoma humano é a adição covalente de um grupamento metil no carbono 5 de cerca de 80% das citosinas que fazem parte do dinucleotídeo CpG (ROBERTSON, JONES, 2000; BAYLIN, OHM, 2006). O domínio C-terminal das enzimas DNA metiltransferases (DNMT) transfere um grupamento metil da S-adenosil-L-metionina (SAM) para a base citosina (BESTOR, 2000). A DNMT1, conhecida como metiltransferase de manutenção, atua durante a síntese de DNA para converter DNA hemimetilado em um estado totalmente metilado(GUIL, ESTELLER, 2009; PATRA, 2008). Por outro lado, a DNMT3a e DNMT3b apresentam atividade de metiltransferase *de novo* e metilam loci previamente não metilados. Esses dinucleotídeos não metilados são encontrados frequentemente em pequenas sequências de DNA ricas em CG, conhecidas como ilhas CpG. Esses trechos de DNA, com 200-2000 pares de bases, apresentam maior frequência de dinucleotídeos CG do que o restante do genoma, compondo a região promotora de determinados genes (JIAND, BRESSLER, BEAUDET, 2004). A metilação do DNA pode inibir estericamente a ligação de fatores de transcrição a promotores dos genes (UMEZAWA et al., 1997). Um segundo mecanismo de silenciamento envolve proteínas que se ligam especificamente a DNA metilado (WADE, 2001). Essas proteínas podem também recrutar co-repressores, incluindo desacetilases de histonas (HDAC e Sin3A) (JONES et al., 1998; NG, 1999). Além disso, as DNA metiltransferases apresentam domínios de repressão da transcrição e podem recrutar HDACs e/ou outras proteínas co-repressoras para o DNA (ESTELLER, 2007).

Além disso, a 5-metilcitosina pode ser desaminada a timina, facilitando a ocorrência de mutação. Assim, acredita-se que a metilação do DNA contribua para a iniciação e progressão do câncer por meio da inativação da expressão gênica (BAYLIN,

1998; HERMAN, 1999). Em determinados tipos de neoplasias hepáticas, a metilação e inativação de genes são observadas inclusive em tecidos pré-neoplásicos, indicando que os dois processos consistem em eventos precoces da carcinogênese (ESTELLER, 2003).

Em comparação com células normais, as células neoplásicas apresentam alterações drásticas no padrão de metilação, geralmente exibindo um estado de hipometilação global, bem como hipermetilação em regiões específicas (JONES, 2002; USHIJIMA, 2005; ESTELLER, 2008). No caso de hipometilação genômica, esta se correlaciona com ativação gênica anormal. Já na hipermetilação evidências sugerem que DNMT1 e DNMT3a atuam em conjunto para estabelecer e manter um fenótipo hipermetilado em células de cânceres, apresentando atividade de metiltransferase aumentada em regiões não metiladas (KANAI, HIROHASHI, 2007; VEECK, ESTELLE, 2010). No segundo caso, mais intensamente estudado, genes são transcricionalmente silenciados em neoplasias devido à hipermetilação da região promotora (ROBERTSON, JONES, 2000). Genes regulados dessa forma incluem os supressores de tumor e os envolvidos com o reparo do DNA, proliferação, diferenciação e outras funções celulares importantes (ESTELLER, 2007).

1.2.2 Acetilação de Histonas

O DNA de eucariotos é condensado e ordenado em uma estrutura dinâmica denominada cromatina. Essa estrutura é formada por unidades básicas de repetição, os nucleossomos, que consistem em aproximadamente duas voltas de DNA ao redor de um octâmero formado por pares de proteínas histonas: H2A, H2B, H3 e H4. Os nucleossomos repetitivos agrupam-se em uma estrutura maior ligada por uma histona H1. Histonas são proteínas básicas com um domínio globular e extremidades amino-terminais ricas em lisina relativamente flexíveis contendo a maior parte dos sítios que sofrem modificação pós-tradução (STRAHL, ALLIS, 2000; TURNER, 2005).

A região amino-terminal, que se exterioriza do nucleossomo, pode sofrer diversas modificações pós-transcricionais, tais como: acetilação, fosforilação, ubiquitinação, e metilação. Existe uma variedade de combinações possíveis entre essas modificações formando uma complexa rede de comunicação ligada a diversos processos biológicos, que ainda permanece em grande parte desconhecida (FICHLE, WANG, ALLIS, 2003). A modificação mais estudada é a acetilação de histonas que esta presente

na H2B, H3 e H4. Na histona H3, podem ser acetilados os resíduos de lisina (K) 9, 14, 18, 23 e 27 e na H4, as lisinas 5, 8, 12 e 16 (SANTOS-ROSA, CALDAS, 2005).

A acetilação neutraliza a carga positiva dos resíduos de lisina (K), diminuindo a afinidade das histonas pelo DNA, que possui carga negativa. Esse evento permite o desprendimento da terminação da histona do nucleossomo, afrouxando a estrutura da cromatina, que favorece o acesso de fatores de transcrição (GRUNSTEIN, 1997).

Nesse sentido, a acetilação de histonas, que podem se apresentar hiperacetiladas em todos os resíduos de lisina, está associada à ativação da transcrição, e assim relacionada com a eucromatina. (GRUSTEIN, 1997). A regulação do estado de acetilação das histonas é comanda pelas enzimas acetilases (HAT) e desacetilases de histonas (HDAC) (DAVIE, 2003; MOTET, CASTRONOVO, 2008). A ruptura do equilíbrio entre as enzimas HAT e HDAC pode levar à perda da atividade normal da célula e, em última instância, ao desenvolvimento da neoplasia (CHUNG, 2002). Dentre as causas desse desequilíbrio estão as mutações nos genes que codificam para as HATs e hiperexpressão de HDACs, com subsequente hipoacetilação de histonas e silenciamento gênico (FRAGA et al., 2005; SANTOS-ROSA, CALDAS, 2005).

Grande parte da remodelação da cromatina parece ocorrer por meio de acetilação e desacetilação de caudas do octâmero de histonas. Evidências sugerem que exista uma correlação entre hipermetilação do DNA, silenciamento transcricional e cromatina estreitamente compactada, indicando que a cromatina seja uma estrutura dinâmica que desempenha um importante papel na regulação da transcrição (WOLFFE, PRUSS, 1996). Assim, acetilação reversível de resíduos de lisina NH2-terminais de histonas nucleares é importante na modulação da topologia da cromatina e na transcrição gênica. A acetilação de histonas relaxa a cromatina que se encontra normalmente superespiralada, aumentando o acesso de proteínas ligadoras do DNA e regulatórias da transcrição a regiões promotoras dos genes(MOTET, CASTRONOVO, 2008; ESTELLER, 2008; TING, McGARVEY, BAYLIN, 2006; VALERI et al., 2009).

Além disso, observou-se que várias das enzimas responsáveis pela acetilação (HATs) e desacetilação (HDACs) de histonas constituem proteínas estimuladoras e repressoras da transcrição, respectivamente [(WOLFFE, PRUSS, 1996; FULLGRABE, KAVANAGH, JOSEPH, 2002) (ver Figura 1). Da mesma forma, constatou-se ainda que regiões inativas do DNA intensamente metiladas, também se encontravam enriquecidas em histonas acetiladas (JEPPESEN, TURNER, 1993). Finalmente, o

processo de metilação do DNA pela DNMT1 pode depender ou produzir um estado alterado da cromatina, via atividade de HDAC (FUKS et al., 2000).

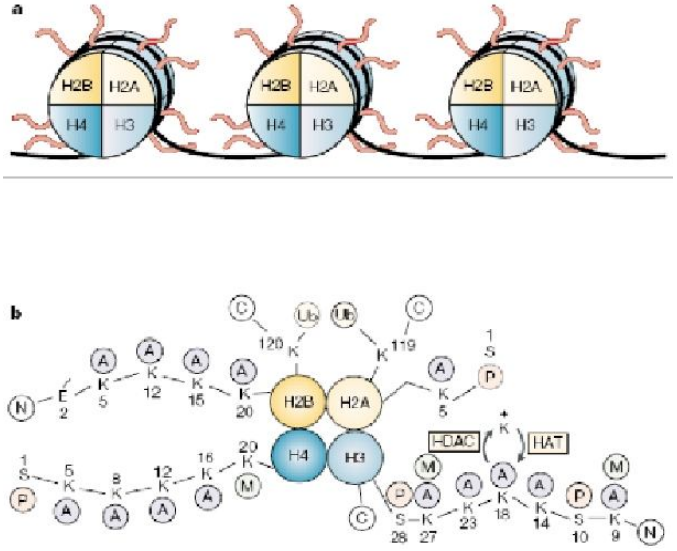


Figura 1: Representação esquemática da estrutura das histonas no nucleossomo. **a.**Histonas H2A, H2B, H3 e H4 enroladas pelo DNA para formar o nucleossomo. Observar a região amino-terminal em vermelho. **b.**Mapa de algumas modificações das histonas. Resíduos de lisina (K) da H2A, H2B, H3 e H4 são sítios potenciais para a ação das HAT/HDAC. A = acetilação; C = região carboxi-terminal; E = ácido glutâmico; M = metilação; N = região amino-terminal; P = fosforilação; S = resíduo de serina; Ub = ubiquitinação. Adaptado de MARKS et al, 2001.

Nesse sentido, a conexão entre metilação do DNA e desacetilação de histonas pode ter importantes implicações terapêuticas (LEONE et al, 2002). Os dois processos parecem atuar em sinergia, apesar de uma densa metilação de “ilhas CpG” ser dominante em relação à desacetilação de histonas, para a manutenção de um estado de silenciamento de genes durante a carcinogênese (CAMERON et al., 1999).

1.3 O Modelo de Carcinogênese do Hepatócito Resistente (HR)

O padrão de desenvolvimento de neoplasias hepáticas em roedores é similar ao que se observa em humanos (ANDERSEN et al., 2010) visto que semelhanças morfológicas, bioquímicas e biológicas em LPN e neoplasias de humanos e roedores foram relatadas. Isto indica que, independentemente dos fatores etiológicos, as mesmas classes de alvos genéticos estão envolvidas na gênese dessas lesões e, ainda, que mecanismos básicos da hepatocarcinogênese em diferentes espécies podem ser semelhantes (FARBER, SARMA, 1987; BANNASCH, HAERTEL, SUR, 2003; FEO et

al., 2006). Nesse sentido, modelos de hepatocarcinogênese vêm sendo considerados dentre os melhores para o estudo de LPN e neoplasias *in vivo.*

Existem diversos modelos disponíveis para estudo dos mecanismos de desenvolvimento de neoplasias hepáticas *in vivo*, a maioria envolvendo os estágios de iniciação e promoção [(GOLDSWORTHY, HANIGAN, PITOT, 1886). Um modelo classicamente utilizado para o estudo da hepatocarcinogênese em ratos é o do Hepatócito Resistente (HR) descrito em 1976 (SOLT, FARBER, 1976), modificado em 1987 (SEMPLE-ROBERTS et al, 1987) e adaptado para ratos Wistar (MORENO et al., 1991). Este modelo é adequado para induzir elevada incidência de LPNs, bem como para se avaliar e comparar os efeitos de substâncias quimiopreventivas capazes de modular o processo carcinogênico (FARBER, SARMA, 1987; OLIVEIRA et al., 2001). Outra característica positiva deste modelo é a possibilidade de se distinguir a reduzida incidência de LPN persistentes (pLPN) do grande número de LPN em remodelação (rLPN) com marcação pela enzima glutationa-S-transferase forma placentária (GST-P) ou γ-glutamiltranspeptidase (γGT) (FEO et al., 2006).

Este modelo consiste na administração única de um agente iniciador, a dietilnitrosamina (DEN) (20mg/100g p.c.), por via intraperitoneal. Após duas semanas, os animais recebem, via intragástrica, 4 doses de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), um potente agente mito-inibitório dos hepatócitos normais e, 24 horas após a última dose são submetidos a uma hepatectomia parcial a 70%, responsável por intenso estímulo mitogênico. Dois e quatro dias após a cirurgia administram-se doses adicionais de 2-AAF, também por intubação gástrica, sendo a eutanásia realizada após 8 semanas da iniciação(SOLT, FARBER, 1976; SEMPLE-ROBERTS, 1987).

A DEN é um potente agente iniciador frequentemente utilizado em estudos dehepatocarcinogênese experimental. Seu metabolismo envolve enzimas do sistema monooxigenase dependente do citocromo p450, principalmente a CYP2E1, que gera metabólitos responsáveis pelo início dos efeitos tóxicos, ocasionados pela formação de peróxido de hidrogênio e ânions superóxidos (P.C.G et al, 1998). Metabólitos ativos da DEN podem formar ligações covalentes com importantes constituintes celulares, resultando em mutações, necrose e neoplasias (YOO, GUEGERICH, YANG, 1988; TRAVIS, BELEFANT, 1992).

O 2-AAF é utilizado como agente promotor por ser tóxico aos hepatócitos normaismas não aos iniciados pela DEN, os quais proliferam e dão origem às lesões préneoplásicas (TRAVIS, BELEFANT, 1992).

Os efeitos mito-inibitórios do 2-AAF são causados pela formação de metabólitos como N-aceto-2-acetilaminofluoreno, 2-nitrosofluoreno e N-hidroxi-2-aminofluoreno, os quais se encontram reduzidos em hepatócitos de LPN quando comparados aos hepatócitos do tecido sem alterações morfológicas ao redor das LPN (*surrounding*). Estes metabólitos podem gerar diferentes adutos causando maior distorção da estrutura do DNA e eficiente bloqueio da replicação deste tanto *in vitro* como *in vivo*, devido a uma interrupção da atividade da DNA polimerase (OHLSON, 1998). O 2-AAF não é capaz, entretanto, de inibir os poucos hepatócitos resistentes (FARBER, 1995) que apresentam, caracteristicamente, atividades das enzimas das fases I e II responsáveis pela metabolização de xenobióticos, diminuídas ou aumentadas, respectivamente (ROOMI et al., 1985).

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

A grande maioria das LPNs, cerca de 95 a 98%, sofre remodelação (ENOMOTO, FARBER, 1982). O processo de remodelação é altamente complexo envolvendo mudanças no suprimento sanguíneo e em características bioquímicas, bem como da estrutura e arquiteturas celulares (FARBER, SARMA, 1987). Acredita-se que este processo possa estar relacionado à rediferenciação dos hepatócitos dos nódulos para um fenótipo semelhante ao de hepatócitos normais (TATEMATSU, NAGAMINE, FARBER, 1983; FARBER, 1980; FARBER, RUBIN, 1991), ou até mesmo que a morte das células por apoptose esteja envolvida nesse processo (SCHULTE-HERMANN et al., 1990). Cerca de 2 a 5% das LPNs são persistentes e geralmente evoluem para as neoplasias.

De qualquer forma, a informação para este evento espontâneo, uma expressão gênica bastante complexa, parece estar já normalmente inserida no genoma (FARBER

et al., 1988; FARBER, RUBIN, 1991; IMAI et al., 1997). Além disso, acredita-se, ainda, que a persistência dos nódulos talvez indique justamente um bloqueio na remodelação por diferenciação celular (FARBER et al., 1988; FARBER, RUBIN, 1991), podendo estar relacionada com uma maior tendência de evolução para os carcinomas hepatocelulares (OHASHI, 1996).

1.4 Relação Dieta, Nutrição e Câncer

Há mais de 30 anos Doll e Peto estimaram que cerca de 35% (com uma variação 10 a 70%) de todas as mortes causadas pelas neoplasias nos EUA poderiam ser atribuídas ou até mesmo prevenidas pela alimentação. Em seus estudos, a dieta foi considerada um contribuinte tão importante quanto o uso de tabaco. Esta hipótese de que a alimentação contribui para a prevenção do desenvolvimento de neoplasias é suportada por propriedades biológicas dos nutrientes: alguns nutrientes são antioxidantes, podem prevenir danos no DNA, auxiliar nos processos de reparo, suprimir a expressão de oncogenes, estimular fatores de crescimento e afetar concentrações hormonais e o sistemaimunitário (DOLL, PETO, 1981).

Dez anos mais tarde, Doll (1992) reviu as suas conclusões, continuando a afirmar que “a estimativa de que o risco de câncer fatal pode ser reduzido em 35% por meio de modificações na alimentação, continua a ser razoável” (DOLL, 1992).

Da mesma maneira, em 1997, o World Cancer Research Fundation concluiu que: “o câncer é principalmente causado por fatores ambientais, dos quais os mais importantes são: o tabaco; a dieta e fatores relacionados à dieta, incluindo massa corpórea e atividade física e exposição à carcinógenos no ambiente de trabalho ou outros locais” (W.C.R.F.I, 1997). Além disso, diversos estudos epidemiológicos indicam que a ingestão de carne vermelha, gordura animal e alguns óleos derivados de plantas, podem aumentar a incidência de neoplasias. Por outro lado, a ingestão de frutas, hortaliças, peixes e seus óleos foi associada com a redução do risco de desenvolver câncer (Cannon, 1997).

Ainda nesse sentido, e também refletindo a importância de estudos da relação dieta-nutrição-câncer, publicação da Organização Mundial de Saúde em conjunto com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer estimou que nas próximas duas décadas ocorrerá um aumento de 50% na incidência de cânceres que culminará, em 2020, em

mais de 15 milhões de casos novos devidos, principalmente, ao maior envelhecimento da população global e à adoção de estilos de vida cada vez mais “ocidentalizados”, incluindo a alimentação. A publicação ressalta, ainda, que 1/3 desses cânceres pode ser prevenido e 1/3 curável, sendo responsabilidade dos governantes dos países de instituir medidas para educação da população quanto à mudança de seus hábitos comportamentais. Os principais alvos seriam ainda o combate ao tabagismo e a adoção de dietas adequadas, além do controle de infecções como as causadas pelo vírus da hepatite C e pelo *Helicobacterpylori* (WILKINSON, 2003).

Nesse sentido, recentemente, diversos estudos buscam elucidar como determinados alimentos e compostos bioativos presentes nos alimentos (CBAs) podem interferir na expressão gênica, com o objetivo de reduzir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como, por exemplo, as neoplasias (ROSS, 2007).

1.5 Quimioprevenção

O método mais adequado de se eliminar o impacto de neoplasias em seres humanos é por meio da prevenção. Em 1976, Sporn definiu o termo quimioprevenção como o uso de compostos naturais ou sintéticos para reverter ou suprimir os múltiplos estágios da carcinogênese (SPORN, 1976). Numerosos exemplos na literatura demonstram que CBAs podem interferir na carcinogênese.

Existem 3 formas conhecidas para se eliminar o impacto do câncer: a prevenção primária, aplicada a indivíduos saudáveis e que inclui, portanto, fornecimento de agentes quimiopreventivos aplicáveis a grandes grupos populacionais, podendo culminar, inclusive, com medidas de Saúde Pública em grande escala; a prevenção secundária, direcionada a pacientes portadores de lesões reconhecidamente pré-neoplásicas, a indivíduos com predisposições genéticas ou maior exposição a carcinógenos, como por exemplo, fumantes, ou ainda, pacientes previamente tratados por meio de quimioterapia e/ou radioterapia (HONG, SPORN, 1997); e a prevenção terciária, que visa evitar metástases ou recidivas do câncer e ainda prevenir cânceres secundários em pacientes curados de sua doença inicial (HONG, 2003; FLORA, FERGUNSON, 2005).

A demonstração da atividade quimiopreventiva de determinados compostos em modelos de experimentação em animais é essencial antes de prosseguir com estudos clínicos (SPORN, SUH, 2002). Portanto, a investigação de mecanismos através dos

quais a alimentação influencia o desenvolvimento do câncer, está não só contribuindo para a elucidação de aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, como também pode ter ainda um grande impacto em estratégias de prevenção (AMES, GOLD, WILLETT, 1995).

Em uma primeira instância, as possíveis maneiras de interferir na fase de iniciação seriam: (a) modificar a ativação do carcinógeno por meio da inibição de enzimas responsáveis por sua ativação ou por sequestro de radicais livres e substâncias eletrofílicas; (b) aumentar a destoxificação do carcinógeno por induzir a atividade de enzimas destoxificantes; e (c) modular processos de reparo do DNA. Além disso, nutrientes também podem atuar na fase de promoção da carcinogênese: (a) sequestrando espécies reativas de oxigênio; (b) alterando a expressão de genes envolvidos na sinalização celular, particularmente aqueles relacionados com proliferação celular, apoptose e diferenciação; (c) diminuindo a inflamação; (d) aumentando a função imune; ou (e) suprimindo a angiogênese (FORMAN et al., 2004).

Devido ao fato da iniciação ser considerada uma etapa irreversível, a intervenção mais efetiva acontece na fase de promoção, que pode ser interrompida e em alguns casos revertida (TROSKO, 2005).

1.6 Tributirina (TB) e Quimioprevenção

O ácido butírico (AB) é produzido pela fermentação de carboidratos por bactérias intestinais (SALMINEM et al., 1998), estando também presente em frutas, hortaliças e na gordura do leite (SCHEPPACH et al., 1992). Independentemente da forma de obtenção, o AB é absorvido pelo intestino delgado ou grosso, com igual eficiência, por difusão passiva ou por bomba de HCO^{-}_{3} /H+ (CUMMINGS, 1981; HEIDOR, 2012).

Mais de 95% do butirato são rapidamente absorvidos e metabolizados assim que chegam ao lúmen intestinal. A maior parte do butirato é metabolizada pelas células do epitélio colônico; por esse motivo, encontra-se concentração reduzida de butirato no sangue portal. A concentração de butirato nas fezes de humanos situa-se em torno de 11 a 25 mM (HAMER, 2007).

Após a absorção intestinal, uma parte do AB resulta em corpos cetônicos, principalmente

3-hidroxibutirato (FIFCH, FLEMING, 1999), e outra parte é metabolizada a butiril-CoA, enoil-CoA, L-hidroxiacil-CoA, acetoacetil-CoA e acetil-CoA (LESCHELLE et al., 2000). No cólon, esse AGCC constitui a primeira fonte de energia, sendo responsável por prover 70 a 90% da energia consumida por estas células (SCHEPPACH, 1992) e desempenhando, portanto, papel essencial no desenvolvimento normal desse órgão (WATKINS et al., 1999).

Em ratos, a absorção do AB é mais eficiente em animais jovens e aumenta proporcionalmente, de acordo com o aumento de sua concentração no lúmen intestinal (FIFCH, FLEMING, 1999).

Mais de 80% do AB absorvido pelo trato gastrointestinal seguem para a corrente sanguínea (FIFCH, FLEMING, 1999) e alcançam o fígado pela veia porta (BEAUVIEUX, 2001). Vale lembrar que o controle de captação e de metabolização do AB pelo fígado é praticamente constante na presença dos outros AGCC (DEMIGNÉ, 1986).

Foram encontrados raros estudos a respeito do metabolismo do AB em células neoplásicas, tendo sido a maioria desenvolvida *in vitro*. Leschelle et al. (2000) demonstraram que células de adenocarcinoma de cólon humano apresentaram metabolismo semelhante ao do colonócito normal, capaz de acumular e oxidar o AB, com formação de corpos cetônicos, porém, em menores concentrações.

Além disso, o sal sódico do AB, o butirato, inibe a proliferação (LESHELLE et al., 2000) e induz a diferenciação e apoptose de uma ampla variedade de linhagens de células neoplásicas (WILLIAMS, COXHEAD, MATHERS, 2003), esta última incluindo, as de cólon (WEI et al., 2008), mama (WILLIAMS, COXHEAD, MATHERS, 2003) e cervical (CHEN et al., 2006). O butirato pode também inibir receptores de estrógenos em células de câncer de mama (PLANCHON et al., 1991; CORADINI et al., 1997).

Mecanismos moleculares da ação anticarcinogênica do butirato incluem também ação como inibidor de desacetilase de histonas (HDACI), resultando em hiperacetilação dessas proteínas, aumento da acessibilidade do DNA a processos de reparo e supressão de vários proto-oncogenes, bem como em reativação e estimulação da expressão de genes supressores de tumor (PARODI, 1997). Ressaltam-se ainda suas propriedades

anti-inflamatórias de melhora da resposta imune e diminuição da angiogênese em diversas linhagens de células neoplásicas (WILLIAMS, COXHEAD, MATHERS, 2003; DRUMMOND et al., 2005).

Apesar de ser considerado um quimiopreventivo promissor (DRUMMOND et al., 2005), o AB é rapidamente metabolizado, o que faz com que seja difícil de serem alcançadas e mantidas concentrações efetivas no sangue (em torno de 0,5 mM). Assim, a utilização de butirato de sódio como agente terapêutico na leucemia resultou em relativo insucesso devido à meia-vida curta do butirato (aproximadamente 6 minutos) nesta forma química (NEWMARK, YOUNG, 1995). Entretanto, a meia-vida do butirato pode ser consideravelmente aumentada se este for administrado na forma de TB (CHEN, BREITMAN, 1994; CONLEY et al., 1998; EGORIN et al., 1999). Esta substância apresenta meia-vida mais prolongada que seu produto AB e pode ser incorporada em emulsões ou cápsulas, de modo a facilitar sua administração oral e o uso em longo prazo (CONLEY et al., 1998; WATKINS et al., 1999; Edelman et al., 2003).

A TB é um triacilglicerol que contêm três moléculas de AB esterificadas com uma molécula de glicerol. Ela está presente no leite e seus derivados (LAI et al., 1997; PARODI, 1997) e, inclusive, foi aprovada como um aditivo de alimentos, sendo utilizada na solubilização de aromatizantes (ANVISA, 2007). Além disso, a TB é um líquido que pode ser administrado oralmente, liberando AB quando hidrolisada pela lipase pancreática, e possivelmente por outras enzimas, alcançando substancialmente concentração plasmática de AB por várias horas (EGORIN et al., 1999).

A TB tem se mostrado bastante promissora, pois é rapidamente absorvida e quimicamente
estável no plasma; difunde-se pelas membranas biológicas permitindo que o butirato liberado exerça seu efeito terapêutico por mais tempo, diretamente na célula alvo. A

meia vida dessa substância é de aproximadamente 40 minutos (EGORIN et al., 1999; EDELMAN et al., 2003; NEWMARK, YOUNG, 1995).

A hidrólise completa de 1 mol de TB pode gerar 3 moles de AB. Assim, em bases molares a TB pode ser 3 vezes mais potente que o AB (CHEN, BREITMAN, 1994). Além disso, não foram encontrados estudos que relatem eventual toxicidade por parte da TB (Figura 2).

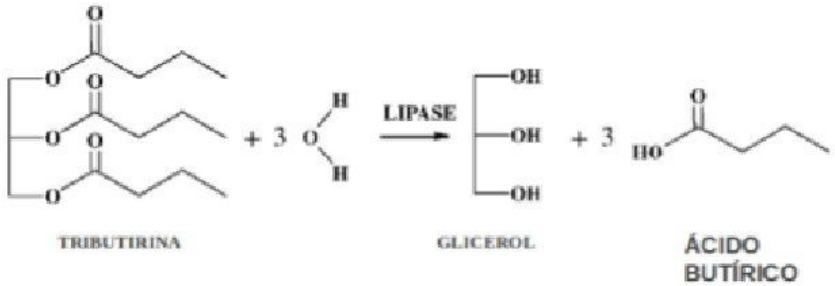


Figura 2: Esquema da hidrólise de uma molécula de TB pela lipase pancreática para dar origem a três moléculas de AB.

Recentemente, em estudos publicados por nosso grupo, demonstrou-se que a administração
de TB (200mg/100g p.c.) a ratos Wistar durante as etapas de iniciação e promoção (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2008), bem como na etapa de promoção (Conti et al., 2011) do modelo de hepatocarcinogênese do HR resultou em maiores concentrações de AB nos fígados desses animais e em atividade quimiopreventiva da carcinogênese, além de apresentar ação epigenética por induzir a acetilação de histonas e a expressão do supressor de tumor p21 (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2008).

1.7 Ácido Fólico (AF) e Quimioprevenção

O ácido fólico (AF), vitamina hidrossolúvel do complexo B (COZZOLINO, 2011), foi isolado em 1941 do espinafre, o que implicou em sua atual nomenclatura derivada desta observação original do composto em folhas (ULRICH, POTTER, 2006). O termo genérico folato é utilizado para designar compostos com estruturas químicas e propriedades nutricionais similares. Suas principais fontes são os vegetais folhosos verdes, crucíferas, aspargos, frutas cítricas, legumes, cereais, grãos integrais, gema de ovo, fígado e outros órgãos e, uma vez que mamíferos não podem sintetizar essa vitamina, a mesma deve ser consumida diariamente (COZZOLINO, 2011; KIM, 2007).

Após entrar na célula, o ácido fólico ingerido pela alimentação é convertido a dihidrofolato
e, logo em seguida, a tetrahidrofolato que pode ser convertido a 10-formiltetrahidrofolato, co-fator para a síntese de purinas ou a 5,10-metileno-tetrahidrofolato. O 5,10-metileno-tetrahidrofolato, por sua vez, pode doar o grupamento metila para o uracil e forma o nucleotídeo timina, que é utilizado para a síntese e reparo

do DNA ou ser transformado a 5-metil THF, a forma predominante na circulação, que atua como doador de grupamentos metil (CH3) para a remetilação da homocisteína a metionina que forma a S-adenosilmetionina (SAM), o doador universal de grupamentos metil para a maioria das reações biológicas de metilação, como é o caso da metilação do DNA (STANGER, 2002; ROSS, 2003; ULRICH, 2005; LARSSON, GIAVANNUCCI, WOLK, 2006) (Figura 3). O metabolismo da homocisteína é dividido em duas vias: a via de transmetilação, dependente de vitamina B12; e via da transulfuração, dependente de B6 (BLOOM, SMULDERS, 2011).

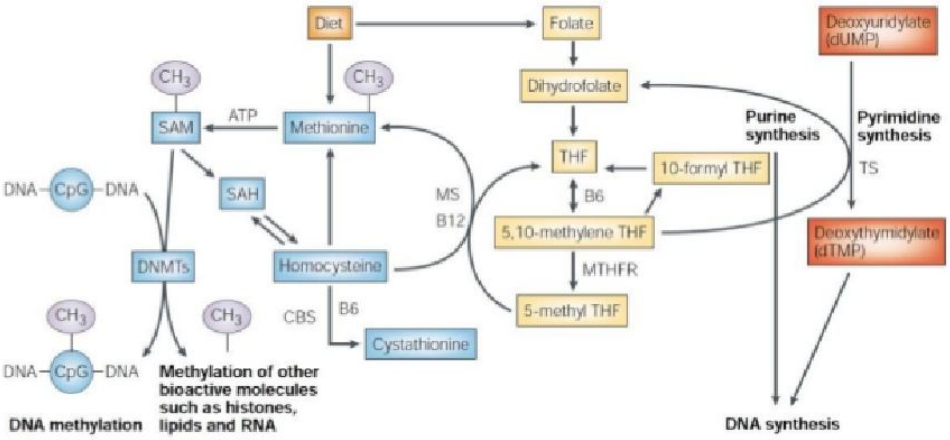


Figura 3: Visão geral do metabolismo dos grupamentos metil. *Diet*, alimentação; *folato*, ácido fólico; *THF*, tetrahidrofolato; *5,10-methylene THR*, 5,10-metilenotetrahidrofolato; *B6*, vitamina B6; *10-formyl-THF*, 10-formil-tetrahidrofolato; *MTHFR*, metileno-tetrahidro-folato-redutase; *5-methyl THF*, 5-metil-tetrahidrofolato; *purine synthesis*, síntese de purina; *dUMP*, desoxiutidilato; *pyrimidine synthesis*, síntese de pirimidina; *TS*, timidalato sintase; *dTMP*, desoxitimidalato; *DNA synthesis*, síntese de DNA; *B12*, vitamina B12; *MS*, metionina sintase; *methionine*, metionina; *homocysteine*, homocisteína; *cystatione*, cistationa; *SAM*, S-adenosil-metionina; *SAH*, S- Adenosilhomocisteína; *DNMTs*, DNA metil-transferases; *CH3*, grupamento metil; *CpG*, ilhas CpG; *DNA methylation*, metilação do DNA; *methylation of other bioactive molecules such as histone, lipids and RNA*, metilação de outras moléculas bioativas como histonas, lipídios e RNA. Figura retirada de Lamprecht e Lipkin (2003).

Com relação à sua biodisponibilidade, o folato é degradado pelo glutamato carboxipeptidase

II, enzima presente na borda em escova intestinal, e entra nas células na forma de monoglutamato basicamente por meio de duas famílias de receptores: o carreador de folato reduzido e os receptores de folato (KIM, 2007). Após a conjugação intracelular do folato em poliglutamatos, constitui-se a forma de armazenamento de folato, o qual ocorre 50% no fígado (STANGER, 2002).

O AF utilizado comercialmente para aplicação em suplementos e na fortificação é uma forma sintética dessa vitamina totalmente oxidada em sua configuração

monoglutamil, altamente estável e 100% biodisponível, o que difere de todas as formas de folato encontradas naturalmente nos alimentos, que são tipicamente reduzidas, instáveis, com absorção diminuída (em torno de 50% menor do que o folato sintético), sendo muito sensíveis aos processos de armazenamento e preparação dos alimentos (relatam-se perdas de até 80% durante o cozimento) (KRISHNASWAMY, NAIR, 2001); McNULTY, PENTIEVA, 2004). Assim, a ingestão de suplementos pode resultar em efeitos fisiológicos distintos do AF ingerido a partir de uma dieta equilibrada e variada.

As características de elevada biodisponibilidade do AF sintético são, inclusive, responsáveis
pela elevação das concentrações plasmáticas dessa vitamina nas populações submetidas à fortificação obrigatória (farinha e produtos contendo grãos e cereais) a partir de 1998 em alguns países como Estados Unidos e Canadá, especialmente em crianças e usuários de suplementos alimentares (KIM, 2007; LINDZON et al., 2009).

No Brasil, a fortificação das farinhas de trigo e milho tornou-se obrigatória pelo Ministério da Saúde e pela Anvisa, conforme estabelecido pela resolução RDC n*o* 344 de 13 de dezembro de 2002, onde consta que cada 100 g de farinha de trigo e milho devem conter 150μg de AF (aproximadamente 40% da RDA). Com isso, alimentos a base de farinhas como pães, macarrão, biscoitos, misturas para bolos e salgadinhos passaram a apresentar maior quantidade de AF em sua formulação final, contribuindo para redução dos índices de defeitos na formação do tubo neural e outras doenças causadas pela deficiência de AF na população brasileira.

Nesse sentido, buscando avaliar o efeito do consumo de suplementos multivitamínicos, Bashir e colaboradores (2004) (BASHIR, FITZGERALD, GOODLAD, 2004) observaram que tanto a deficiência quanto a suplementação com
vitaminas (entre elas o AF) contribuíram para o desenvolvimento do processo neoplásico intestinal (número de pólipos e o peso dos tumores), tendo a suplementação promovido o processo de forma mais intensa. Assim, as vitaminas parecem desempenhar um papel importante na carcinogênese.

Postula-se que haja dois principais mecanismos proeminentes, genéticos e epigenéticos, respectivamente, pelos quais o AF poderia estar envolvido com a modulação da carcinogênese: (a) por meio da indução da incorporação errônea de uracil no DNA, que pode implicar em danos cromossômicos, erros na síntese e reparo do

DNA e (b) através da modulação da metilação do DNA, resultando em alteração de expressão gênica de proto-oncogenes e genes supressores de tumor (LARSSON, GIOVANNUCCI, WOLK, 2006; KIM, 2007).

Como os derivados metabólitos do folato apresentam a capacidade de se ligar a unidade de um carbono, que são, entre outros, constituintes dos grupamentos metil (CH3), essa via bioquímica deixa implícito que um fornecimento suficiente de folato é um prérequisito para a metilação adequada do DNA (ROSS, 2003; BOLLHEIMER et al., 2003), de modo que alterações nesse processo representam um dos mecanismos para explicar os efeitos paradoxais que o AF apresenta na carcinogênese (KIM, 2004; KIM, 2007).

Tanto fatores ambientais como, por exemplo, a deficiência de AF e a ingestão elevada de etanol, como fatores de exposição em nível experimental, como os carcinógenos químicos (DEN e o 2-AAF), induzem hipometilação do material genético (POIRIER, 2002; ROSS, 2003). Além disso, o folato é considerado um dos fatores que podem influenciar a disponibilidade de SAM e podem ter impacto no processo de metilação (ROSS, 2003).

Há relatos de que suplementação com AF em humanos com doses de 12,5; 25 e 50 vezes a IDR (Ingestão Diária Recomendada) é capaz de aumentar a metilação genômica (CRAVO et al., 1995; KIM et al., 2001; KIM, 2004; PUFULETTE et al., 2005). Interessantemente, efeito semelhante foi observado com a deficiência de AF, que promoveu aumento da metilação do DNA genômico do cólon (KIM et al., 1997; SOHN et al., 2000), e do fígado (SONG et al., 2000; KOTSOPOULOS, SOHN, KIM, 2008).

Estudos utilizando ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR evidenciaram

que o tratamento com SAM, 10 semanas após a iniciação, reduziu o número e o tamanho das LPN (PASCALE et al., 1996; SIMILE et al., 1996). Em nível celular e molecular, o tratamento com SAM reduz a síntese de DNA, aumenta o número de rLPN (FEO et al., 1985; SIMILE et al., 1996), induz a apoptose (GARCEA et al., 1989) e reduz a expressão de oncogenes previamente hipometilados, como por exemplo o *cmyc*.

Assim, esses resultados sugerem que o tratamento com precursores da SAM, como o AF, possa também resultar em efeitos quimiopreventivos durante a hepatocarcinogênese (PASCALE et al., 2002).

Diferentes estudos com modelos de hepatocarcinogênese em ratos resultantes de dietas deficientes em folato e grupamentos metil (deficiência em folato, colina e metionina) indicam que essa deficiência promoveu a progressão de neoplasias no fígado (KUO et al., 2008) e a hipometilação genômica de LPN, a qual pode desregular os processos apoptóticos e de proliferação celular, favorecendo o desenvolvimento de neoplasias (Pogribny et al., 2004).

De fato, constatou-se que a deficiência de folato provoca instabilidade genômica e aumento de danos no DNA no fígado de ratos (Pogribny et al., 1995). Considerando o papel central do AF na síntese e metilação do DNA e a análise de modificações moleculares ocorridas já em LPN, o modelo do HR pode proporcionar pistas em relação a alterações fundamentais subjacentes ao desenvolvimento da neoplasia (EMMERT-BUCK et al., 1996).

Estudo realizado por Chagas et al (2011), utilizando o modelo do RH revelou que nas fases de iniciação e seleção/promoção o ácido fólico atuou como agente quimiopreventivo nas doses de 0,16mg/100g p.c., porém na dose de 0,08mg/100g p.c. não foi encontrada essa diferença. Além disso, foi encontrado maior número de rLPN, diminuição do dano ao DNA e da expressão do oncogene *c-myc*. Assim, acredita-se que suplementação com o AF possa modular a hepatocarcinogênese, em sua etapa de promoção, por esta vitamina estar diretamente relacionada com os processos genéticos de manutenção da integridade e estabilidade do DNA e epigenéticos de reversão da hipometilação global deste.

2. Objetivo

Avaliar a atividade quimiopreventiva da TB e do AF, bem como da associação entre os mesmos (AS). Além disso, verificar a existência de adição nos mecanismos destes dois compostos.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos, albinos, da linhagem Wistar, com pesos iniciais compreendidos entre 90 e 110g e obtidos da colônia do biotério da Universidade Estadual de Campinas, do estado de São Paulo (UNICAMP-SP) O.

Os animais permaneceram durante todo o experimento nas seguintes condições: temperatura de 22°C ± 2°C e ciclo de iluminação claro-escuro de 12h, iniciando-se às 7hrs. Foram mantidos em gaiolas de polipropileno (não excedendo a 4 animais por caixa) com tampas de aço inoxidável e assoalho forrado com maravalha previamente esterilizada, trocada rotineiramente em dias alternados. Esses tiveram livre acesso à água filtrada e ração comercial peletizada para roedores de laboratório (Nuvilab CR-1; Nuvital Nutrientes S/A; Colombo/PR; Brasil), sendo ainda controlados o consumo de ração e suas massas corpóreas diariamente. A ração era constituída de carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e de aminoácidos. Os níveis garantidos bem como os componentes adicionados por quilograma de produto pelo fabricante da ração encontram-se apresentados nas Tabelas 1 e 2. O lote da ração foi mantido do início até o término do experimento.

Tabela 1: Valores garantidos pelo fabricante por quilograma de ração

Componente	Quantidade (%)
Umidade (máxima)	12,5
Proteína Bruta (mínima)	22,0
Extrato Etéreo (mínimo)	4,0
Matéria Mineral (máximo)	10,0
Matéria Fibrosa (máxima)	8,0
Cálcio (máxima)	1,4
Fósforo (mínima)	0,8

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

Tabela 2: Quantidades adicionadas pelo fabricante por quilograma de ração

Componente	Quantidade (%)
Vitamina A	13000UI
Vitamina D3	1800 UI
Vitamina E	30,0 mg
Vitamina K3	3,0 mg
Vitamina B_1	5,0 mg
Vitamina B_2	6,0 mg
Vitamina B_6	7,0 mg
Vitamina B_{12}	20,0 mcg
Niacina	60,0 mg
Ácido Pantotênico	20,0 mg
Ácido Fólico	1,0 mg
Biotina	0,05 mg
Colina	600,0 mg
Ferro	50 mg
Manganês	60 mg
Zinco	60 mg
Cobre	10 mg
Iodo	2 mg
Selênio	0,05 mg
Cobalto	1,5 mg
Lisina	100 mg
DL-metionina	300 mg
Antioxidante	100 mg

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

O ensaio biológico foi realizado nas dependências do biotério da Faculdadede Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF/IQ-USP), após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Protocolo CEUA n° 320) **(anexo 1)**.

3.2 Modelo de Hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”

Utilizou-se para induzir a hepatocarcinogênese nos animais o modelo do HR descrito por Solt e Farber (1976), modificado por Semple-Roberts et al. (1987) e adaptado para ratos Wistar por Moreno et al. (1991).

A iniciação da carcinogênese ocorreu pela administração intraperitoneal de dose necrogênica do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN; Sigma, EUA; 20mg/100g de peso corpóreo [p.c.]) dissolvido em solução de NaCl a 0,9%. Após um período de recuperação de 2 semanas os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses únicas em dias consecutivos, por intubação gástrica, de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF; Sigma; 2mg/100g p.c.) dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho. Vinte e quatro horas após a última aplicação de 2-AAF os animais foram submetidos a um potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial a 70%, realizada de acordo com Higgins e Anderson (1931). Para isto, os animais foram submetidos a anestesia inalatória com éter etílico (Merck, Brasil). Por fim, no segundo e no quarto dia que sucederam a hepatectomia parcial os animais receberam por gavagem doses de 2-AAF (0,75 e 1mg/100g p.c., respectivamente) também dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho e foram eutanasiados 8 semanas após a iniciação.

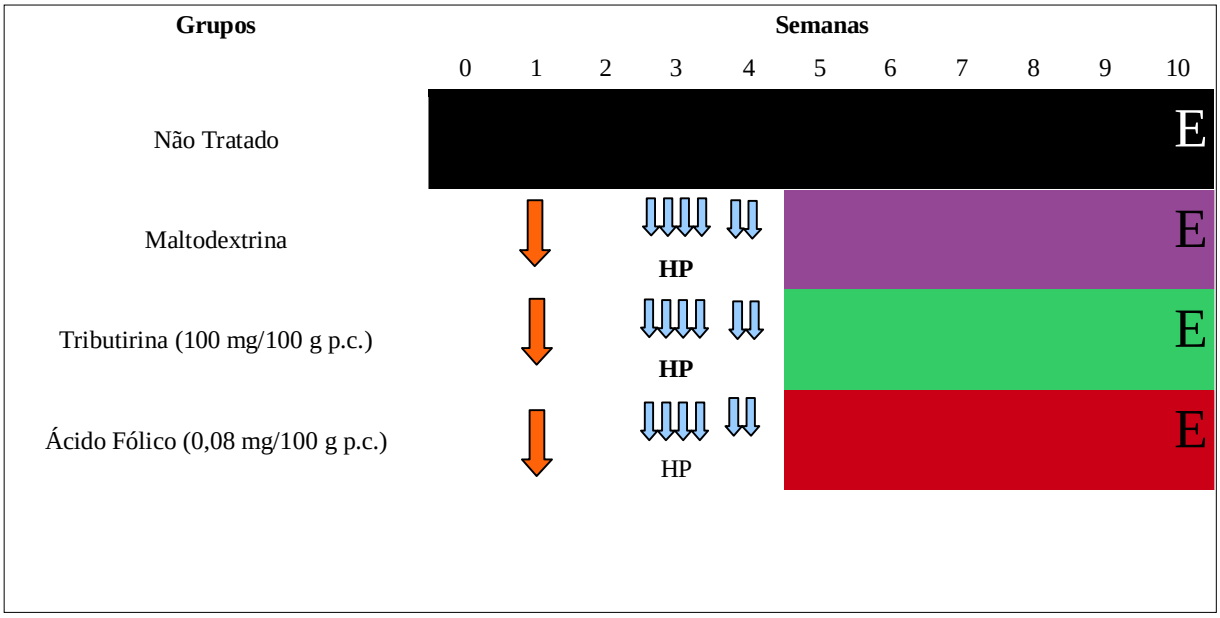
3.3 Protocolo Experimental

Após um período de aclimatação de 7 dias, 44 animais foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do HR e distribuídos aleatoriamente em diferentes grupos experimentais. Além desses, 6 animais constituíram um grupo de ratos não tratados, e que não foram submetidos a qualquer procedimento experimental durante todo o estudo, mas que permaneceram nas mesmas dependências em que os outros grupos experimentais até serem eutanasiados. Segue representação esquemática da distribuição dos animais, bem como, os diferentes protocolos de tratamento (Figura 4).

- **Grupo Não Tratado "NT":** composto por 6 animais que não foram submetidos a procedimento experimental;
- **Grupo Maltodextrina "MD":** composto por 11 animais submetidos ao

modelo HR e que receberam maltodextrina (150mg/100g p.c.; controle isocalórico; Nestlé) por intubação gástrica, diariamente, a partir do 3º dia após a última dose de 2-AAF, durante 6 semanas consecutivas, até a eutanásia;

- **Grupo Tributirina "TB":** composto por 11 animais submetidos ao modelo do HR e tratados por intubação gástrica, com TB (100mg/100g p.c.; Sigma), diariamente, a partir do 3º dia após a última dose de 2-AAF, durante 6 semanas consecutivas, até a eutanásia;
- **Grupo Ácido Fólico "AF":** composto por 11 animais submetidos ao modelo do HR e tratados por intubação gástrica, com AF (0,08mg/100g p.c.; Sigma), diariamente, a partir do 3º dia após a última dose de 2-AAF, durante 6 semanas consecutivas, até a eutanásia;
- **Associação "AS":** composto por 11 animais submetidos ao modelo HR e tratados por intubação gástrica, com TB (100mg/100g p.c.; Sigma) e AF (0,08mg/100g p.c.; Sigma), diariamente, a partir do 3º dia após a última dose de 2-AAF, durante 6 semanas consecutivas, até a eutanásia.



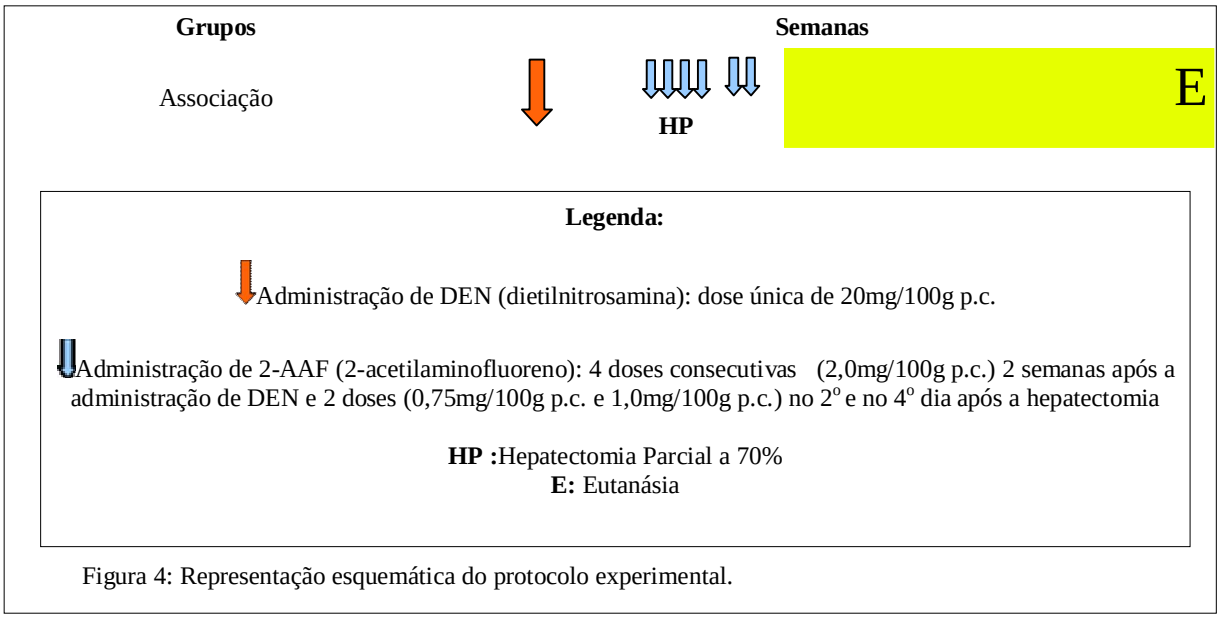


Figura 4: Representação esquemática do protocolo experimental.

Para controle da quantidade energética ingerida na forma de TB (6Kcal/g; (GIOIELLI, 2002)), todos os outros grupos experimentais submetidos ao modelo do HR que não receberam esse agente inibidor da desacetilase de histonas, receberam maltodextrina por intubação gástrica, em quantidades isocalóricas.

Da mesma forma, para controle da intubação gástrica, todos os grupos experimentais submetidos ao modelo do HR que não receberam AF, receberam água por intubação gástrica.

3.4 Eutanásia dos Animais

Na ocasião da eutanásia, os animais permaneceram em jejum durante 12 horas e foram pesados antes do procedimento. Em seguida, os mesmos foram submetidos a anestesia inalatória com éter etílico (Merck). Após entrarem em plano anestésico foram posicionados em decúbito dorsal horizontal, realizando a laparotomia e punção cardíaca para coleta de sangue.

A eutanásia se deu por meio de secção da aorta abdominal e consequente choque hipovolêmico. Por fim, retirou-se o fígado, o qual foi lavado em solução salina gelada a 0,9% e pesado em balança eletrônica digital, seguindo-se, então, o exame macroscópico do mesmo.

3.5 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 distinguiram do parênquima hepático. Essas formações denominadas de LPN (BANNASCH, ZERBAN, 1990), foram classificadas pelo seu diâmetro em "<1mm" ou "≥ 1mm". Após o exame da superfície, cada lobo foi seccionado em fatias de aproximadamente 0,3 cm de espessura, sendo então, identificadas e contadas as lesões nodulares internas.

Posteriormente, foram colhidas amostras de cada lobo hepático dos animais para análise morfométrica de LPN, apoptose, proliferação celular e análises imunoistoquímicas. Estes fragmentos de fígado foram imediatamente fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas.

Os lobos hepáticos foram separados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e em seguida, armazenados em "freezer" a -80ºC (Revco, EUA).

3.6 Dupla Marcação Imunoistoquímica

Após desparafinização e rehidratação, cortes de fígado com 5µm foram tratados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% em PBS durante 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Após, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas mergulando-se as lâminas em solução a 3% de leite em pó desnatado em PBS (NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 10mM; KCl 2,68mM; KH_2PO_4 1,76mM e água ultra-pura, pH 7,40) durante 1 hora. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-PCNA (Dako, Dinamarca) na diluição de 1:200 em albumina sérica bovina a 1% (BSA 1%) em câmara úmida a 4°C durante 16 horas, tratadas com anticorpo secundário biotinilado universal (anti-mouse/coelho) por 30 minutos e, posteriormente, com o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos (LSAB+ System-HPR, Dako, Dinamarca). Após a lavagem das lâminas, foi realizada a revelação pela diaminobenzidina (DAB - Sigma – EUA) por 1 minuto. As lâminas, então, foram mantidas em água por 5 minutos, tratadas com Levamisole (Dako, Dinamarca) para bloqueio da fosfatase alcalina endógena, incubadas com anti-GST-P (MBL, Japão) 1:1000 em BSA 1% por 1 hora a temperatura ambiente seguido de tratamento com sistema de polímero (Dako Cytomation EnVision, 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 foi realizada lavagem dos cortes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (HSU, RAINE, 1981). O controle negativo das reações foi realizado subtraindo-se o anticorpo primário e substituindo-o por albumina sérica bovina (1% em PBS).

3.7 Imunoistoquímica para H3K9

Após desparafinização e rehidratação, cortes de fígado com 5µm foram tratados com HCl 2N durante 1 hora em banho maria, seguido de aquecimento em tampão citrato no micro-ondas e resfriamento para realização da recuperação antigênica. A etapa seguinte foi a do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% em PBS durante 20 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Após, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas mergulando-se as lâminas em solução a 3% de leite em pó desnatado em PBS (NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 10mM; KCl 2,68mM; KH_2PO_4 1,76mM e água ultra-pura, pH 7,40) durante 1 hora. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-acetil histona H3 (K9) (Cell Signaling, Estados Unidos da América) na diluição de 1:100 em albumina sérica bovina a 1% (BSA 1%) em câmara úmida a 4°C durante 16 horas, tratadas com anticorpo secundário biotinilado universal (anti-mouse/coelho) por 30 minutos e, posteriormente, com o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos (LSAB+ System-HPR, Dako, Dinamarca). Após a lavagem das lâminas, foi realizada a revelação pela diaminobenzidina (DAB - Sigma – EUA) por 1 minuto. As lâminas, então, foram mantidas em água por 5 minutos. As lâminas foram coradas com hematoxilina e contra coradas com água amoniacal. Entre todas as etapas foi realizada lavagem dos cortes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (HSU, RAINE, 1981). A especificidade das marcações foi controlada subtraindo-se o anticorpo primário e substituindo-o por albumina sérica bovina (1% em PBS).

3.8 Procedimento para Quantificação de LPN GST-P Positivas

O número (n/cm^2), o tamanho médio (mm^2) e a porcentagem de área ocupada por LPNs GST-P positivas, persistentes ou em remodelação, bem como a área total dos fragmentos hepáticos foram determinadas utilizando-se o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha). Este recurso permite que a área de cada corte histológico do fígado, assim como de cada lesão GST-P positiva, seja medida por um

sistema de mosaico, onde são retiradas fotos sequenciais do corte histológico e remontadas em uma única fotomicrografia.

3.9 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 LPN (persistente ou em remodelação). Para tanto, foi utilizado o microscópio Axio Imager M2 (Carls Zeiss, Alemanha). Os dados foram expressos em número de núcleos em fase S/mm^2 de área do *surrounding*, pLPN e rLPN.

3.10 Quantificação da Apoptose

Os hepatócitos em apoptose e corpos apoptóticos foram quantificados pelo método de H&E(LEVIN et al., 1999) utilizando-se microscópio (Axio Imager M2; Carls Zeiss; Alemanha). O número destes em cada grupo foi contado no surrounding, pLPN e rLPN. A leitura foi realizada varrendo-se toda a lâmina e o resultado foi expresso em número de hepatócitos em apoptose/mm2 de *surrounding*,pLPN e rLPN.

3.11 Determinação da Concentração Hepática de Ácido Butírico

As amostras dos fígados foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em homogenizador manual com acetonitrila e o padrão interno (butirato de etila – Sigma Aldrich, Alemanha). Após a homogeneização os tubos foram centrifugados, o sobrenadante recolhido e aplicados no cromatógrafo à gás para a quantificação do ácido butírico. As amostras e os padrões foram injetados em um CG HP6890 (Agilent, Palo Alto, California), com uma coluna CP Wax 58 – FFAP (Varian 25m x 0.32m x 0,21 m). A injeção em splitless foi feita a 200°C. O sistema de injeção por splitless é ideal para análise de compostos de nível traço, pois previne a introdução de compostos não voláteis da amostras. O gás hélio foi usado como carreador, a uma taxa de 0,1 mL/min. O forno foi mantido à 50°C nos primeiros 3 minutos, e depois a temperatura foi aumentada para 250°C. A análise foi registrada por um detector seletivo de massas HP5973 (Agilent, Palo Alto, Canada), usando um detector de ionização.

3.12 Determinação de Folato e Cobalamina Séricos

As concentrações de folato e cobalamina foram determinadas por método microbiológico, utilizando-se cepas de *Lactobacillus casei* (O'BROIN, KELLEHER, 1992) e de *Lactobacillus laishmannii* (KELLEHER et al., 1987; KELLEHER, BROIN, 1991), respectivamente.

As análises foram feitas em placas de ELISA com 96 poços (Sarstedt), nas quais colocou-se o meio de cultura, os controles, as amostras, em 8 replicatas/amostra, e óleo mineral (Sigma Life Science), para evitar perda por evaporação. As placas foram seladas com um adesivo de vedação (Sarstedt) e colocadas em uma estufa a 37°C durante 40 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Multiskan FC (Thermo Scientific).

3.13 Determinação da Metilação Global de DNA

3.13.1 Extração de DNA

Inicialmente pesou-se cerca de 150mg de tecido hepático total em balança analítica. As amostras de fígado foram submetidas à homogeneização com 1,5 mL de solução de lise de células (Qiagen Kit) acrescida de desferroxamina (Sigma) 0,5 mM com a finalidade de evitar a oxidação do DNA durante o processo de extração. Aos homogenatos obtidos adicionou-se 22,5 µL de proteinase K (Sigma) 20 mg/mL. As amostras foram invertidas 25 vezes e permaneceram incubadas à temperatura ambiente por uma noite. Após o período de incubação, foram adicionados 6 µL de ribonuclease A (Sigma) homogeneizando as amostras por inversão 25 vezes e novamente incubando-as por duas horas à temperatura ambiente. Transcorrido este período, adicionou-se 0,75 mL de solução de precipitação de proteínas e procedeu-se a homogeneização por 20 segundos em

vórtex seguida da centrifugação a 2000*g* por 10 minutos. Mantendo o cuidado de não transferir as proteínas do sedimento e da porção superior, a porção intermediária do centrifugado fpo coletada com o auxílio de pipeta Pasteur e transferida para tubos contendo 1,5 mL de isopropanol gelado. Inverteu-se os tubos cerca de 50 vezes até a completa precipitação do DNA, que foi transferido para tubos contendo 600 µL de uma solução de clorofórmio com 4% de álcool isoamílico para extração de proteínas, com o propósito de purificar o DNA. Após homogeneização e centrifugação a 2000g por 10 minutos, coletou-se a fase aquosa e o mesmo procedimento foi repetido. Ao final da

segunda extração, a fase aquosa foi transferida para tubos contendo 1,2 mL de etanol absoluto e 60 µL de uma solução de NaCl 5M. Os tubos foram invertidos novamente até completa precipitação do DNA, seguida de nova centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos, para descartar o sobrenadante. O DNA obtido foi então lavado duas vezes com 450 µL de etanol 70% para retirada de sais presentes na amostra, sendo que entre cada lavagem procedeu-se uma centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Após secagem ao ar. As amostras foram ressuspensas em 200 µL de desferroxamina 0,1 mM e mantidas sob refrigeração por uma noite.

A concentração de DNA foi determinada pela mensuração da absorbância em 260 nm e a sua pureza foi estabelecida com base na razão da absorbância 260/280 nm (DNA/Proteína), empregando-se para tanto Espectrofotômetro Analítica Biochrom Libra S12. As amostras de DNA foram mantidas estocadas a -20°C para análises posteriores.

3.13.2 Hidrólise do DNA

Alíquotas correspondentes a 150 µg de DNA de fígado foram pipetadas em um volume de água milliQ suficiente para um volume final de 200 µL. Adicionou-se 7,5 µL de tampão Tris $MgCl_2$ 200 mM (pH 7,4), 1,4 µL do padrão interno [$^{15}N_5$1,N^6-dAdo/$^{15}N_5$1,N^6-dGuo (250 fmol/µL) e 6 µL (15 unidades) de DNAse (Sigma). As amostras foram incubadas à 37°C, 90 rpm por 1 hora. A seguir adicionou-se 6 µL (0,006 unidades) de fosfodiesterase (Sigma) e 7,5 µL (15 minutos) de fosfatase alcalina (Sigma), incubando-se novamente à 37°C, 90 rpm por 1 hora. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 14000g por 10 minutos. Alíquotas de 10 µL foram retiradas para quantificação dos desoxinucleosídeos (dCyd, dAdo e dGuo) e de 5-metildC (metilação global do DNA) por CLAE/PDA.

3.13.2.1 Técnica de CLAE

As análises e purificações realizadas com UV/VIS foram conduzidas em um equipamento da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos DAD-20AV, um auto-injetor (proeminence SIL-20AC e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A. Os dados foram processados pelo software LC-Solution 1.21 (Shimadzu, Japão).

3.13.2.2 Solução Padrão

O padrão de 5-metil-2'-desoxicitidina (5-metil-dC) foi obtido por purificação a partir de DNA de timo de bezerro (Sigma) hidrolizado enzimaticamente, utilizando-se um sistema de CLAE. Sua identidade foi confirmada pelas seguintes características espectrofotométricas: espectro de absorbância em H_2O: CH_3OH (6:1, v/v) λ_{mx} 277nm; espectro de absorbância em ácido fórmico 0,1%:CH_3OH (19:1, v/v) λ_{mx} 286nm; ESI-MS (modo positivo): *m/z* 242 $[M+H]^+$, *m/z* 126 $[M-2'\text{-desoxirribose}+H]^+$.

As concentrações das soluções de 5-metil-dC e dC foram calculadas através da determinação da absorbância em água, utilizando-se os respectivos coeficientes de extinção molar (ε): 5-metil-dC, $\varepsilon = 8500\ M^{-1}cm^{-1}$ em (λ) = 277 nm; dC, (ε) = 9000 $M^{-1}cm^{-1}$ em $\lambda = 271$ nm.

3.13.2.3 Sistema Analítico

As alíquotas de DNA foram injetadas no sistema analítico de CLAE-DAD. A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises: Sistema Cromatográfico 4. Coluna Luna C18 (2) 250mm x 4,6 mm ID, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma prι-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluνda com um gradiente de αcido fσrmico (0,1% em αgua) e CH3OH (0-25 min, 0-18% de CH_3OH; 25-27 min, 18-0% de CH_3OH; 27-37 min, 0% de CH_3OH), com um fluxo de 1mL/min, 30°C. O detector de DAD foi fixado em 260 nm para a quantificação da dC e 286 nm para a quantificação da 5-metil-dC. Curvas de calibração foram feitas no intervalo de 0,05-6 nmol para dC e de 0,005-0,4 nmol para 5-meil-dC.

3.14 Avaliação da Acetilação no Resíduo de Lisina 9 da Histona 3 (H3K9)

3.14.1 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.

Para extração de histonas, cerca de 100 mg de tecido hepático foram homogeneizadas com 500 µL de tampão de lise gelado [HEPES (10mM; pH = 7,9; USB, EUA); Triton X – 100 (1%, USB, EUA); MgCl2 (1,5 mM; Sigma Aldrich, EUA);

KCl (10 mM; Merck, Alemanha); Butirato de sódio (5 mM; Sigma Aldrich, EUA); DTT (0,5 mM; Invitrogen, EUA); PMSF (1,5 mM; Sigma Aldrich, EUA) Inibidor de Protease (1µg/mL; Sigma Aldrich, EUA); Inibidor de Fosfatase, (1µg/mL; Sigma Aldrich, EUA)] e centrifugado por 5 minutos a 5000 g e 4ºC. Após centrifugação foram observadas duas fases (pellet e sobrenadante). O pellet foi lavado com 500 µL de tampão de lise gelado. Foi adicionado ao pellet 200 µL de HCl 0,2 N, o qual foi incubado por uma noite a 4°C. Após este período as amostras foram centrifugadas por 5 min a 15000 g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o pH ajustado para 7 (25 µL de NaOH 2M para cada 200 µL de solução). As histonas foram quantificadas pelo método de Bradford de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Scientific, EUA) e armazenadas a -80ºC

3.14.2 Western Blot de H3K9 Acetilada

Os extratos de proteína foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 15% e tampão Tris-glicina 1X, utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (Mini PROTEAN®System, Bio Rad, EUA). Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose Hybond-ECLTM (Amersham Biosciences, EUA), com poro de diâmetro de 0,20µm durante 35 min. Realizou-se o bloqueio da membrana com reagente próprio presente no sistema de quimioluminescência ECL (Enhanced Chemiluminescence, GE Heathcare, Reino Unido), diluído em PBS-T (1mL de PBS com 10% tween para cada 20mg de ECL) e incubada por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-acetil H3K9 (Upstate, EUA) (1:1000) diluído em reagente ECL, por uma noite a 4°C. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP anti-imunoglobulina de coelho (GE Healthacare, Reino Unido) na diluição 1:10000 em reagente ECL por 1 hora. A membrana foi então incubada com anticorpo primário anti-H1 (Upstate, EUA) (1:5000) em reagente ECL por 1 h a 37°C e sob agitação, servindo para controle da técnica, e em seguida incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP anti-imunoglobulina de rato (GE Healthacare, Reino Unido) na diluição 1:10000 em ECL por 1 h, em 37°C e sob agitação. A imunodetecção foi feita utilizando-se o sistema de quimioluminescência ECL e o sinal captado utilizando o sistema de aquisição de imagens ImageQuant 400 (GE Healthcare, Reino Unido).

3.15 Análise Estatística

Foram utilizados testes estatísticos paramétricos (ANOVA com pós-teste de Tukey) quando os resultados apresentaram distribuição normal; do contrário, foram utilizados métodos não paramétricos (Kruskall Wallis pós-teste de Dunn). Para os dados da análise macroscópica foi utilizado o teste exato de Fisher. Em todos os casos foi adotado o nível de significância $p<0,05$. O software utilizado foi o GraphPad – Instat 3.

4. Resultados

4.1 Dados Gerais

A Figura 4.1 mostra os dados de evolução de peso corpóreo dos animais durante o período experimental. Nota-se que, durante os períodos de administração da DEN, de 2-AAF e do procedimento de HP a 70%, os animais dos grupos submetidos ao modelo do HR (MD, TB, AF e AS) apresentaram perda de peso em relação ao grupo NT (Figura 5), o mesmo ocorrendo para consumo de ração (Figura 6). Porém, somente os grupos tratados com TB, AF e AS apresentaram menores valores de ganhos e de pesos finais em relação ao grupo NT ($p<0,05$; Figura 5). Em relação à média de peso hepático relativo, somente o grupo tratado com AS apresentou menor valor quando comparado ao controle isocalórico MD ($p<0,05$; Tabela 3).

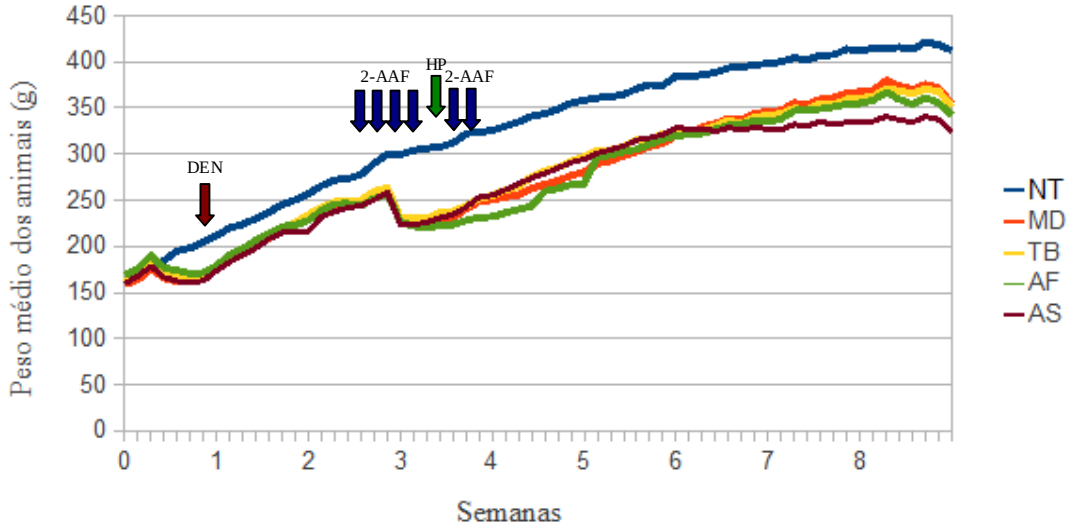


Figura 5: Evolução do peso de ratos Wistar NT ou tratados com MD, AF, TB e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"; NT = não tratado; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF = ácido fólico; S (TB+AF) = associação; DEN = dietilnitrosamina; 2-AAF = 2-acetilaminofluoreno; HP = hepatectomia parcial a 70%.

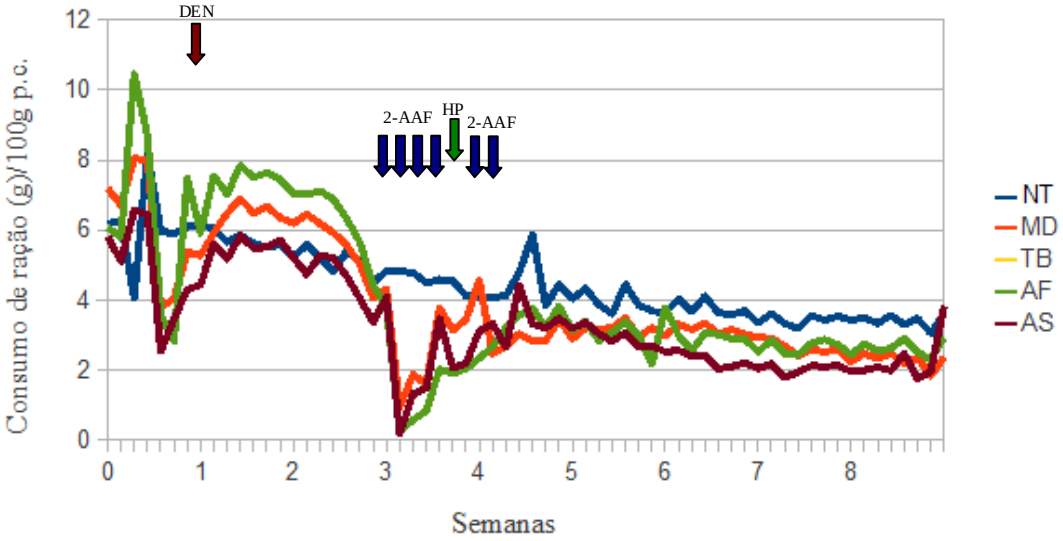


Figura 6: Consumo de ração de ratos Wistar NT ou tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"; NT = não tratado; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF = ácido fólico; AS (TB+AF) = associação; DEN = dietilnitrosamina; 2-AAF = 2-acetilaminofluoreno; HP = hepatectomia parcial a 70%.

Tabela 3: Ganho de peso, peso corpóreo final e peso hepático relativo de ratos Wistar "N" ou tratados com TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente".

Grupos (n)	Número de Animais	Peso Corpóreo Final (g)*	Ganho de Peso Corpóreo*	Peso Hepático Relativo (n/100g p.c.)*
NT	6	412,5±15,7	302,8±15,7	3,1±0,23

MD	7	353,8±10,7	249,4±7,5	3,38±0,23
TB	6	351,2±12,9[a]	241,3±11,3[a]	2,93±0,09
AF	6	351,3±12,6[a]	244,2±13,8[a]	2,90±0,04
AS	7	323,3±17,8[a]	215,4±18,8[a]	2,66±0,18[b]

NT = não tratado; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF = ácido fólico; AS (TB+AF) = associação; p.c. = peso corpóreo; n = peso do fígado; *média±EPM; [a,b]diferença em relação ao grupo NT e MD ($p<0,05$), respectivamente, segundo o teste ANOVA pós-teste Tukey.

O exame macroscópico do fígado mostrou que o controle isocalórico MD apresentou maior número médio de nódulos quando comparado aos grupos tratados com TB, AF e AS, porém sem diferença estatística. Além disso, não houve diferença na incidência de nódulos entre os grupos (Tabela 4). Entretanto, no que diz respeito ao tamanho dos nódulos (< 1 e ≥ 1mm), o grupo tratado com AF apresentou menor porcentagem de nódulos < 1 mm e maior de ≥ 1mm em relação ao controle isocalórico MD ($p<0,05$; Tabela 4). Em contrapartida, os grupos tratados com TB e AS apresentaram maior porcentagem de nódulos < 1 mm e menor de ≥ 1 mm quando comparadas ao controle isocalórico MD ($p<0,05$; Tabela 4).

Tabela 4: Incidência, número médio e porcentagem de nódulos visíveis à macroscopia dos fígados de ratos Wistar tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

Grupos (n)	Ratos com LPN	Incidência de Nódulos (%)	Número Médio de Nódulos *	% Nódulos	
				< 1	≥ 1
MD	6/7	71,4	8,14±4,78	37	63
TB	5/6	83,3	0,57±0,16[a]	65[a]	35[a]
AF	2/6	33,3	0,33±0,25[a]	0[a,b]	100[a,b]
AS	4/7	57,1	0,36±0,15[a]	90[a]	10[a]

MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF = Ácido Fólico; AS (TB+AF) = associação; *média±EPM; [a,b]diferença em relação ao grupo MD e TB ($p\leq0,03$), respectivamente, segundo o Teste Exato de Fisher.

Além da análise macroscópica, foram realizados cortes histológicos para marcação imunoistoquímica com anti-GST-P, para distinção entre pLPN e rLPN (Figura 7) e análise do número, tamanho médio e área hepática ocupada pelas mesmas. De modo geral, os animais tratados com TB, AF e AS apresentaram menor número de pLPN em relação ao grupo MD. Além disso, o grupo AF também apresentou menor número de rLPN tanto em relação a MD como a TB ($p<0,05$; Tabela 5). No que diz respeito ao tamanho das pLPN, os grupos tratados com AF e AS apresentaram menores valores médios comparados ao controle isocalórico MD, sendo que o grupo AF também

apresentou menor valor em relação a rLPN comparado a MD ($p<0,05$; Tabela 5). Em adição, os grupos tratados com AF e AS apresentaram menores valores de área hepática ocupada por rLPN em comparação ao controle isocalórico MD, sendo que o grupo tratado com AS também apresentou menor área hepática ocupada por pLPN em relação a MD ($p<0,05$; Tabela 5). Além disso, o grupo TB apresentou menores valores médios de área e de porcentagem da área ocupada do corte, empLPN quanto por rLPN (Tabela 5).

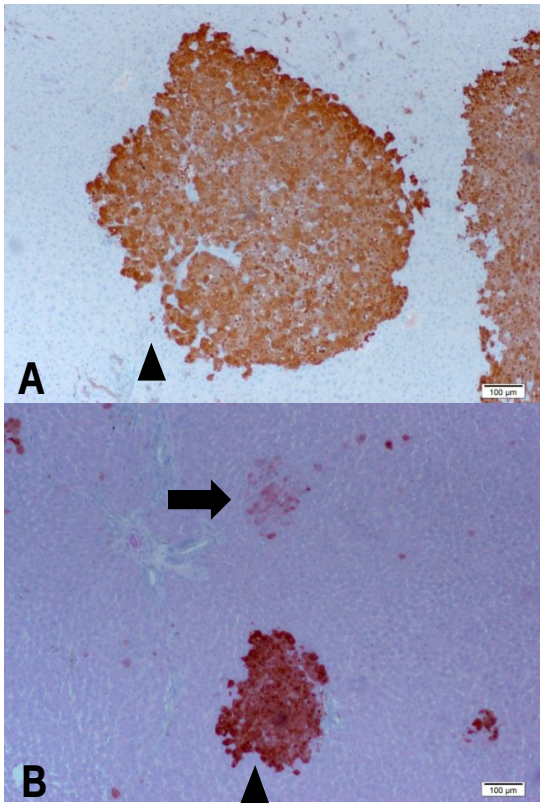


Figura 7: Imagens representativas de A e B – marcação imunoistoquímica para GST-P, grupos MD e AF, respectivamente, cabeça de seta corresponde a pLPN e seta a rLPN (objetiva de 10x).

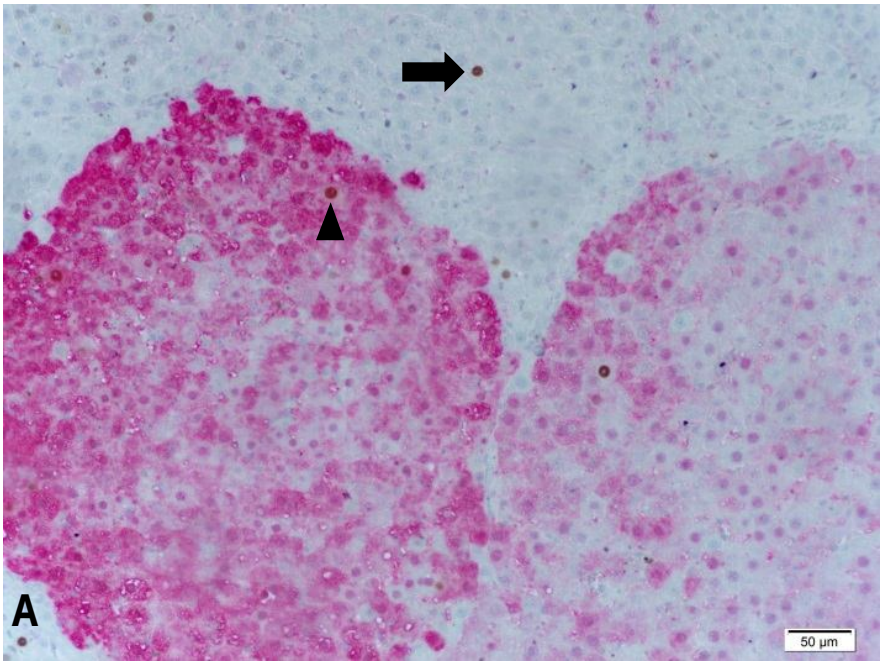
Tabela 5: Número, área e porcentagem de LPN em cortes histológicos de fígado de ratos Wistar tratados com MD, TB, AF ou AS, durante a etapa de promoção de hepatocarcinogênese pelo modelo do "Hepatócito Resistente"

Grupos (n)	Número de LPN/cm^2*		Área das LPN/mm^2*		% da área do corte ocupada por LPN	
	pLPN*	rLPN*	pLPN*	rLPN*	pLPN*	rLPN*
MD(7)	30,36±6,2	35,10±4,88	0,44±0,016	0,16±0,06	16,1±7,21	6,32±2,306
TB(6)	14,72±3,20[a]	43,38±7,35	0,13±0,02[a]	0,07±0,01	1,94±0,48[a]	3,04±0,698
AF(6)	12,95±1,48[a]	22,52±2,78[ab]	0,06±0,01[a]	0,04±0,005[a]	0,81±0,188[a]	0,87±0,199[a]
AS(7)	8,16±1,15[a]	31,01±5,72	0,07±0,01[a]	0,04±0,008[a]	0,55±0,098[a]	1,43±0,349[a]

n = número de animais; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF = Ácido Fólico; AS (TB+AF) = associação; pLPN = lesão pré-neoplásia persistente; rLPN = lesão pré-neoplásia em remodelação; *média±EPM; [a,b]diferença em relação ao grupo MD e TB, respectivamente ($p \leq 0,05$), segundo o este ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

4.2 Avaliação de Proliferação Celular e Apoptose

Os grupos tratados com AF e AS apresentaram menor número de núcleos PCNA positivos (Figura 8) em fase S/mm^2 em relação ao controle isocalórico MD, tanto no *surrounding* como em pLPN e rLPN ($p<0,01$; Figura 9). Além disso, os grupos tratados com AF e AS também apresentaram menor número de núcleos PCNA positivos em fase S/mm^2 de rLPN comparados ao grupo tratado com TB ($p<0,01$; Figura 9). Em adição, não houve diferença entre os grupos TB e MD (Figura 9).



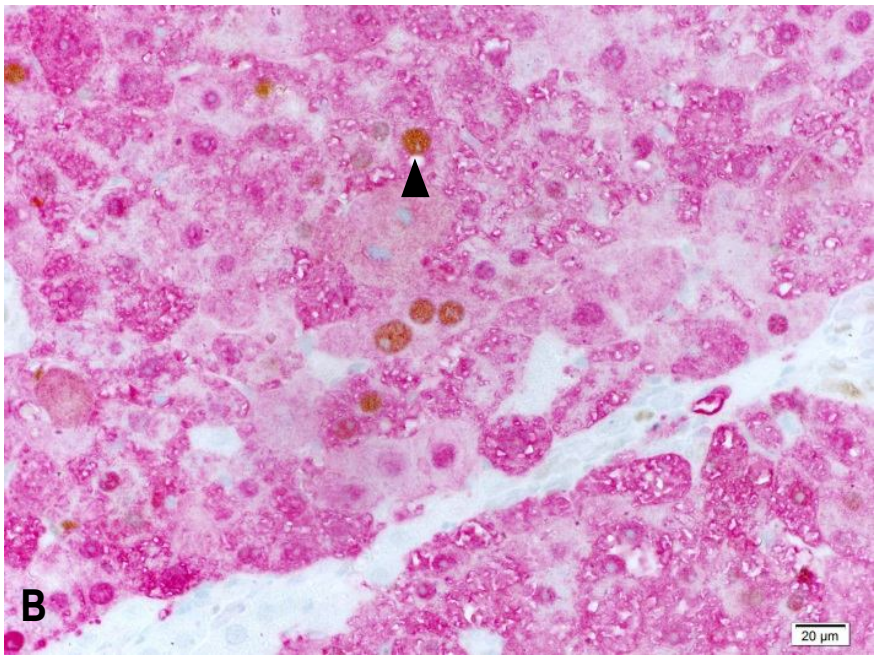


Figura 8:Imagens representativas de A e B – núcleos PCNA positivos (fase S), do grupo MD, dentro de pLPN (cabeça de seta) e *surrounding* (seta) (objetiva de 20x e 40x, respectivamente).

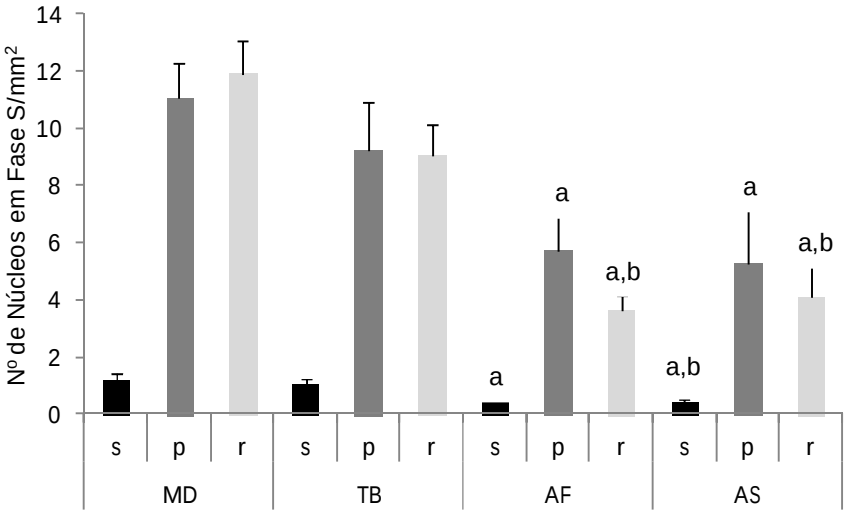
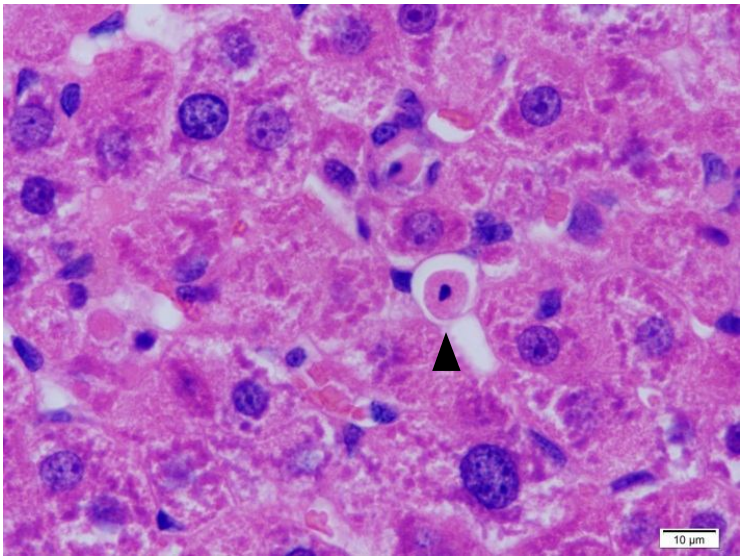


Figura 9: Quantificação de células marcadas para PCNA (fase S) (n^o/mm^2) de área de *surrounding*, pLPN e rLPN de fígado de raots Wistar tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF = ácido fólico; AS (TB+AF) = associação; ^{a,b}diferença em relação ao grupo MD e TB, respectivamente (p<0,01), segundo o teste ANOVA pós-teste Tukey.

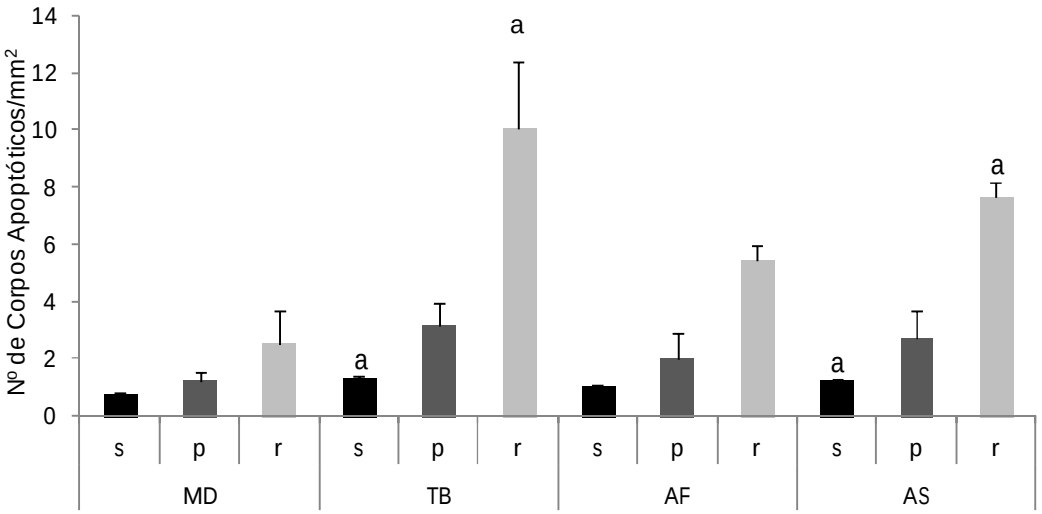
No que diz respeito a apoptose (Figura 10), os grupos tratados com TB e AS apresentaram maior número de hepatócitos em apoptose e corpos apoptóticos/mm2 em relação ao controle isocalórico MD, tanto no *surrounding* como em rLPN (p<0,01;

Figura 11). Além disso, mesmo



significância o grupo AF aumentou o número de hepatócitos em apoptose e corpos apoptícos/mm² em rLPN.

Figura 10: Imagem representativa de apoptose (cabeça de seta), do grupo AS, corado por H&E (objetiva 100x).



a

Figura 11: Quantificação de hepatócitos em apoptose e corpúsculos apoptóticos (n^o/mm^2) por área de *surrounding*, pLPN e rLPN de fígado de ratos Wistar tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"; MD = maltodextrin (controle); TB = tributirina; AF = ácido fólico; AS (TB+AF) = associação; [a]diferença em relação ao grupo MD ($p<0,01$), segundo o teste de Kruskal-Wallis pós-teste Dunn.

4.3 Quantificação Hepática de Ácido Butírico

Os grupos tratados com TB e AS apresentaram maior concentração hepática de ácido butírico comparados com os grupos NT, MD e AF ($p<0,001$) (Figura 12).

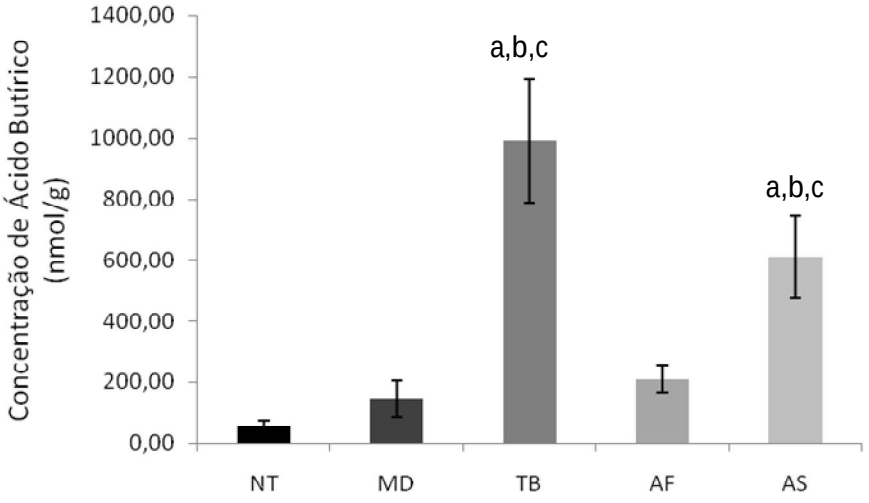


Figura 12: Quantificação das concentrações hepáticas de ácido butírico em ratos Wistar "NT" e tratados com MD, TB, AF e AS. "NT" = "não tratado"; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF = ácido fólico; AS (AF+TB) = associação; [a] diferença em relação ao grupo N ($p<0,001$); [b] diferença em relação ao grupo MD($p<0,001$); [c] diferença em relação ao grupo AF ($p<0,001$), segundo o teste Kruskal-Wallis pós-teste Dunn

4.4 Determinação Sérica de Folato e B12

Os grupos tratados com AF e AS apresentaram maior concentração sérica de folato em relação aos não-tratados (NT, MD e TB) ($p<0,001$; Figura 13). No que diz respeito às concentrações séricas de vitamina B12 não foram encontradas diferenças entre os grupos (Figura 14).

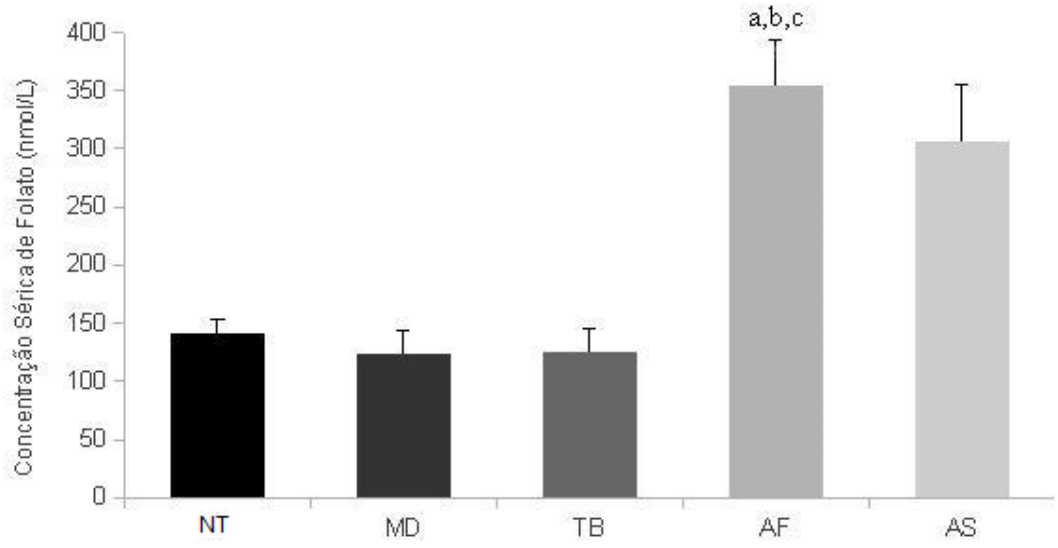


Figura 13: Quantificação das concentrações séricas de folato de ratos Wistar NT e tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"; NT = não tratado; MD = maltodextrina; TB = tributirina; AF = ácido fólico; AS (TB+AF) = associação; [a,b]diferença em relação ao grupo MD e TB, respectivamente ($p<0,001$), segundo o teste ANOVA pós-teste Tukey.

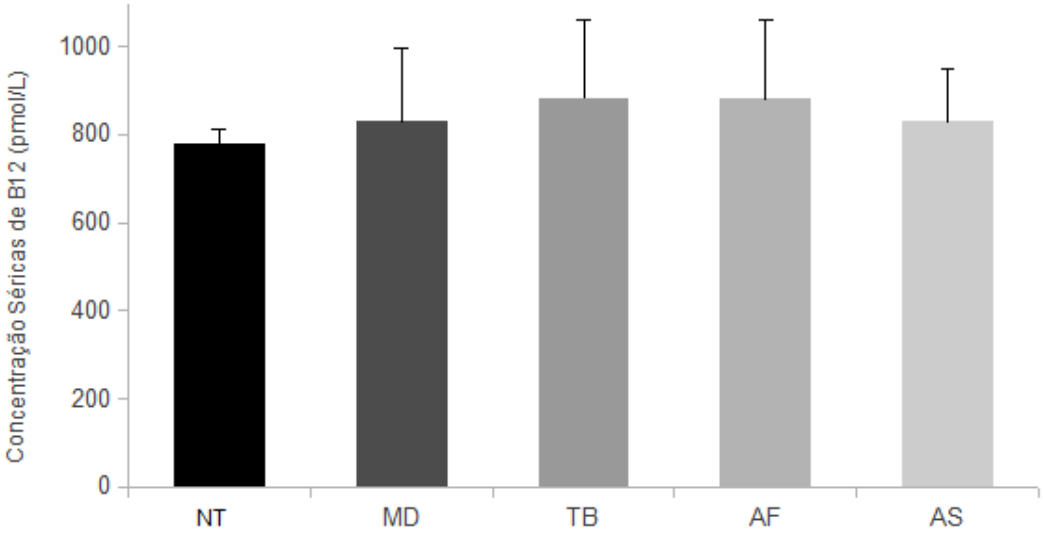


Figura 14: Quantificação das concentrações séricas de B12 de ratos Wistar NT e tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente";

NT = não tratado; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF – ácido fólico; AS (TB+AF) = associação.

4.5 Metilação Global do DNA

Não foram encontradas diferenças entre os grupos na porcentagem de 5-metil-dC em tecido hepático total (Figura 15).

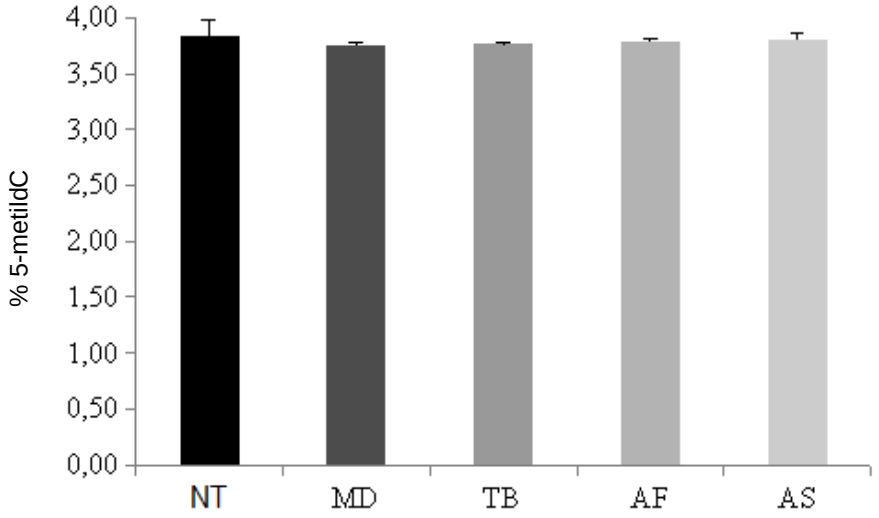
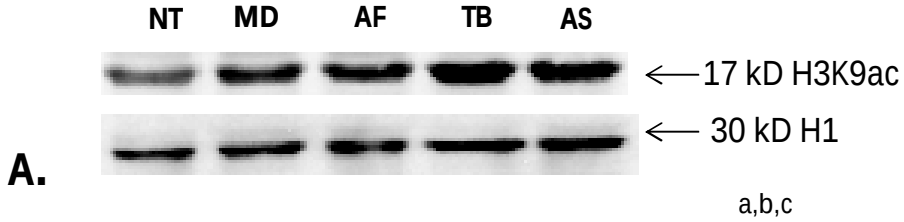


Figura 15: Quantificação da metilação global de DNA e tecido hepático total de ratos Wistar NT e tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"; NT = não tratado; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF – ácido fólico; AS (TB+AF) = associação.

4.6 Western Blot de H3K9 Acetilada

De acordo com os dados representados graficamente na Figura 4.8, observa-se que o grupo controle (MD) apresentou padrão de acetilação H3K9 semelhante ao do grupo N, não submetidos a qualquer tratamento, e ao do grupo AF. Além disso, o grupo TB e o grupo AS apresentaram maior acetilação de H3K9, quando comparados aos grupos NT, MD e AF (Figura 16).



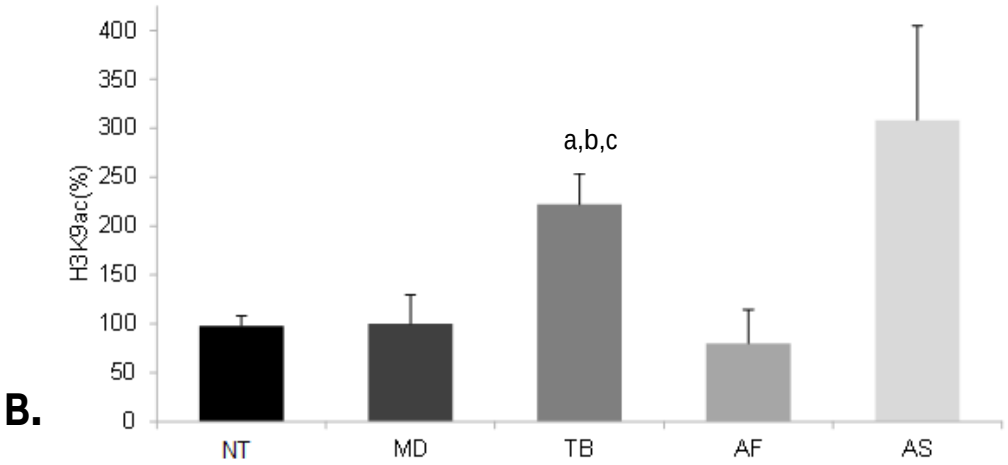


Figura 16: Western blot das proteínas H3K9 acetilada e H1. (A) Imagem representativa de western blot das proteínas H3K9ac e H1 realizado com proteína hepática do fígado de ratos dos grupos NT, MD, AF, TB e AS. (B) Quantificação da porcentagem de acetilação de H3K9 de ratos Wistar NT e tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"; NT = não tratado; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF – ácido fólico; AS (TB+AF) = associação. [a,b,c]diferença em relação ao grupo NT, MD e AF, respectivamente ($p<0,001$), segundo o teste de Kruskal-Wallis pós-teste Dunn.

4.7 Marcação Imunoistoquímica de H3K9 Acetilada

Os grupos TB, AF e AS apresentaram menor porcentagem de pLPN e rLPN marcadas para H3K9 acetilada no citoplasma (Figura 17) em relação ao grupo controle isocalórico MD ($p<0,002$; Figura 18). Além disso, todos os grupos apresentaram arcação nuclear em diferentes intensidades, porém as mesmas não foram quantificadas.

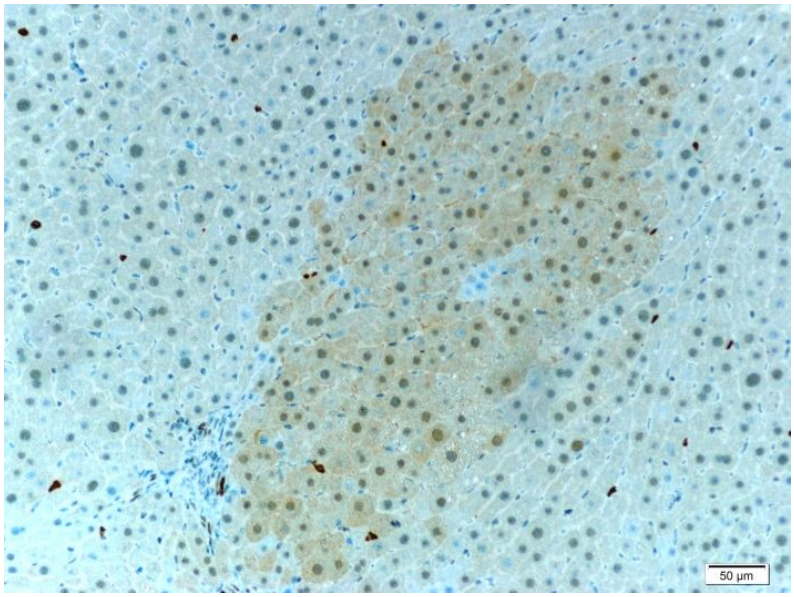


Figura 17: Imagem representativa de marcação imunoistoquímica para H3K9 acetilada no citoplasma de pLPN (objetiva 20x).

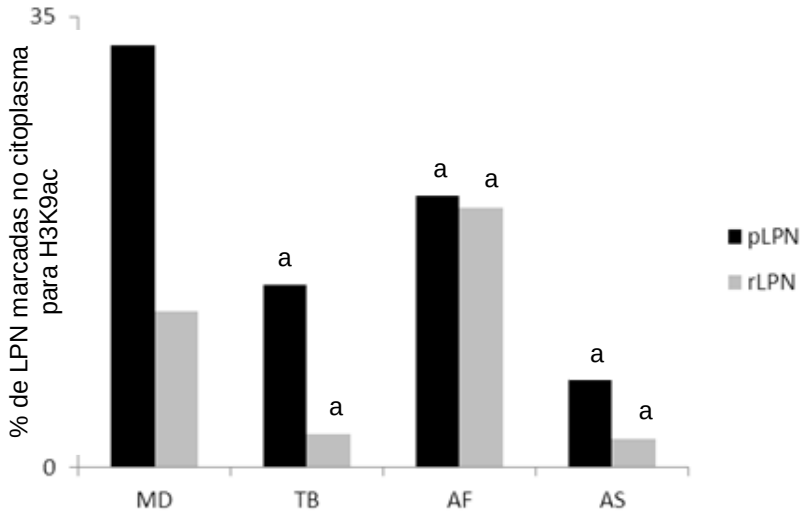


Figura 18: Porcentagem de marcação de acetilação de H3K9 no citoplasma de ratos tratados com MD, TB, AF e AS, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"; MD = maltodextrina (controle); TB = tributirina; AF – ácido fólico; AS (TB+AF) = associação. [a]diferença em relação ao grupo MD, ($p<0,002$), segundo o teste exato de Fisher.

5. Discussão

No presente estudo, objetivou-se avaliar os efeitos quimiopreventivos do tratamento com TB, AF e AS no fígado de ratos Wistar machos submetidos ao modelo do HR. Houve diminuição no peso corpóreo final e ganho de peso durante o experimento nos grupos tratados com TB, AF e AS em relação ao grupo NT que pode ser explicado pela aplicação do modelo HR nestes grupos, visto que, em relação ao grupo isocalórico MD não foram encontradas diferenças (Tabela 3) $p< 0,05$). Entretanto, o peso hepático relativo foi menor no grupo AS em relação ao grupo MD, indicando menor número e/ou tamanho das LPNs, o que demonstra já durante a eutanásia, os efeitos benéficos da associação entre TB e AF. Nas análises macroscópicas, pôde-se comprovar estes efeitos dos tratamentos com TB, AF e AS em relação a MD. No que diz respeito a porcentagem de nódulos, os grupos TB, AF e AS apresentaram menor número médio de nódulos, mesmo sem diferença estatística. Em

relação à porcentagem de nódulos macroscópicos, constata-se que os tratamentos com TB e AS foram efetivos na diminuição do tamanho dos nódulos, visto que os mesmos apresentaram maior porcentagem de nódulos menores que 1mm e menor porcentagem de nódulos maiores que 1mm, o que demonstra, também, que o tratamento foi efetivo na diminuição do número de nódulos, mesmo sem diferença estatística (Tabela 4). Além disso, vale ressaltar que o grupo grupo AF apresentou apenas dois nódulos, sendo estes maiores que 1mm, justificando a porcentagem máxima de nódulos (Tabela 4). Em adição, à microscopia, os grupos tratados com TB e AS apresentaram menor número de pLPN em relação ao grupo MD, demonstrando, mais uma vez, o potencial quimiopreventivo destes compostos mesmo com a administração da metade das doses já padronizadas em nosso laboratório ($p<0,05$; Tabela 5) (CONTI et al, 2011; CHAGAS et al., 2011; KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2008).

Além disso, os grupos tratados com AF e AS apresentaram efeito quimiopreventivo, eventualmente, mais pronunciado do que o grupo tratado com TB, demonstrado pela diminuição do tamanho médio e porcentagem de área ocupada por LPNs (Tabelas 5). Estes dados inferem que a ação quimiopreventiva do grupo AS parece ter maior relação com a presença de ácido fólico e não da tributirina, embora esta também contribua nesta atuação quimiopreventiva do grupo AS mesmo de forma minoritária.

Em estudos prévios do grupo foi constatado efeito quimiopreventivo da TB na dose de 200mg/100g p.c (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2008; CONTI et al., 2011). No presente estudo, foi utilizada dose de 100mg/100g p.c., pois a dose de 200mg/100g p.c. é considerada alta para ser administrada ao ser humano. Estudo realizado por Martin J. Edelman et al, 2003, demonstrou que a dose de 200mg/kg é considerada elevada para a ingestão pelo ser humano visto que seria necessário grande número de cápsulas de TB ao dia (28 cápsulas, três vezes ao dia). Por esse motivo, faz-se importante estudar o efeito da TB em doses reduzidas, visto que mesmo com atividade quimiopreventiva menos pronunciada do que as anteriormente publicadas pelo grupo (CONTI et al., 2011), a tributirina (grupos TB e AS) aumentou a apoptose (Figura 11) e a acetilação da histona H3K9 (Figura 15) em relação aos grupos MD e AF.

Alterações na acetilação de histonas podem modificar a estrutura da cromatina e levar à perda da regulação da transcrição de genes que controlam o ciclo celular, a apoptose, e a diferenciação (MARKS et al., 2001). A acetilação neutraliza a carga

positiva dos resíduos de lisina (K), diminuindo a afinidade das histonas pelo DNA, que possui carga negativa. Esse evento leva ao desprendimento da terminação da histona do nucleossomo, afrouxando a estrutura da cromatina e permitindo o acesso de fatores de transcrição (GRUNSTEIN, 1997). Além disso, a ruptura do equilíbrio entre enzimas HAT e HDAC pode levar à perda da atividade normal da célula, e em última instância, ao desenvolvimento de neoplasias (CHUNG, 2002). Dentre as causas dessa alteração estão as mutações nos genes que codificam para as HATs e hiperexpressão de HDACs, com subseqüente hipoacetilação de histonas e silenciamento gênico (FRAGA et al., 2005; SANTOS-ROSA; CALDAS, 2005).

O modo pelo qual o AB inibe a atividade da HDAC permanece não esclarecido, mas sabe-se que a inibição é reversível (GIBSON, 2000). Existem hipóteses de que duas moléculas do AB poderiam ocupar o sítio hidrofóbico da enzima de forma a inibi-la. Outros estudos sugerem que o AB atua por mecanismo de inibição não-competitiva (DAVIE, 2003).

Em estudos prévios do grupo foi constatado que a tributirina atua como inibidora da desacetilase de histonas, o que foi comprovado nesse estudo com metade da dose utilizada anteriormente (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2008; CONTI et al., 2011). De acordo com o resultado obtido da avaliação da acetilação de H3K9 constatou-se que os grupos TB e AS apresentaram maior acetilação de H3K9 em relação ao grupo controle isocalórico MD (Figura 15). Isso indica que a tributirina pode ter ocasionado a inibição das HDAC's, provavelmente por meio da sua metabolização à AB, permitindo maior atividade de HAT's e consequentemente aumento da acetilação de histonas. Esses dados são compatíveis com a literatura, uma vez que a desacetilação de histonas constitui evento precoce em diversos tipos de neoplasias (FRAGA et al., 2005). Além disso, o grupo MD apresentou maior porcentagem de LPN marcadas pela H3K9 acetilada no citoplasma em relação aos grupos TB, AF e AS (Figura 17), indicando, provavelmente, maior severidade destas lesões (KANAO et al., 2008)

No que diz respeito ao ácido fólico, em estudo realizado por Chagas e colaboradores (2011) foram administradas doses de 0,08mg/100g p.c. (4 vezes a RDA) e 0,16mg/100g p.c. (8 vezes a RDA) de AF na fase de iniciação e seleção/promoção da hepatocarcinogênese pelo modelo HR, com obtenção de efeito quimiopreventivo pronunciado somente com a dose de 0,16mg/100g p.c. No presente estudo foi utilizada dose de 0,08mg/100g p.c. e observou-se o efeito quimiopreventivo discutido

anteriormente, bem como diminuição na taxa de proliferação celular, fato não observado por Chagas e colaboradores (2011).

Conforme já descrito em modelo de carcinogênese de cólon (KIM, 2003; KIM, 2004; KIM, 2007), a ação do AF é dependente tanto da dose quanto da etapa da carcinogênese em que o tratamento é iniciado. De fato, Kim e colaboradores (1996) observaram que o AF, quando administrado por 20 semanas em ratos submetidos ao modelo de câncer colorretal na fase de iniciação e promoção, em doses de 0, 1 e 4 vezes a RDA (a qual foi utilizada no presente estudo) apresenta capacidade de reduzir, com um perfil dose-dependente, a proporção de ratos com nódulos neoplásicos e a média dos mesmos por rato, nas doses de até 4 vezes a RDA. No entanto, quando utilizada dose 20 vezes maior que a RDA, além de não apresentar efeitos benéficos, houve tendência a um aumento da proporção de animais com neoplasias macroscópicas e a média das mesmas por rato (KIM et al., 1996).

Resultados similares foram observados por Song e colaboradores (2000) que constataram que o AF apresentou efeito quimiopreventivo, em camundongos, reduzindo o número de ACFs e de pólipos ileais durante os 3 meses iniciais da evolução do processo carcinogênico, período no qual as concentrações plasmáticas de AF estavam inversamente correlacionadas com o número destes pólipos e de ACFs, sendo a dose mais efetiva a de 10 vezes a RDA. Porém, em etapas mais avançadas (6 meses), a administração de doses de AF da ordem de 1, 4 e 10 vezes a RDA promoveu aumento de 70% no número de pólipos ileais em relação a um grupo que ingeriu ração sem AF. Os autores observaram ainda que as concentrações plasmáticas de AF estavam diretamente correlacionadas com o número de pólipos ileais (SONG et al., 2000). Assim, a análise macro e microscópica das LPN hepáticas marcadas pela GST-P, indica que os efeitos do AF na promoção da hepatocarcinogênese em ratos dependem de sua dose e, além disso, sabe-se que o AF pode exercer tais efeitos através da modulação de fenômenos como a proliferação celular, por estar envolvida na síntese e metilação do DNA. Conforme descrito na literatura, células de HCC apresentam hipometilação global do DNA (POGRIBNY, RUSYN, 2012). No presente estudo esta não foi observada (Figura 14) pelo fato de haver somente LPN e não neoplasias, além da técnica de CLAE ter sido realizada com amostra de tecido hepático total, ou seja, não somente com pLPN, consideradas como as que evoluem para neoplasias.

De acordo com o esperado, os grupos AF e AS apresentaram maior concentração sérica de folato (Figura 12), o que sugere que a atuação na proliferação celular dos mesmos é devido ao ácido fólico. Por outro lado, as concentrações de B12, não diferidas entre os grupos (Figura 13), indica que uma suplementação de folato não exerceu influência na concentração de cobalamina, mesmo ambos estando envolvidos na mesma via metabólica (LAMPRECHT, LIPKIN, 2003).

No que diz respeito ao grupo AS, foi observado maior número de hepatócitos em apoptose e corpúsculos apoptóticos/mm^2 em relação ao grupo MD e AF (Figura 11), bem como menor proliferação celular quando comparado aos grupos MD e TB (Figura 9). Portanto, conforme hipotetizado, a associação entre TB e AF parece agir de forma aditiva em relação aos mecanismos da TB e do AF. Além disso, parece não haver antagonismo nos mecanismos de ação estudados entre os compostos em questão.

Assim, tanto os compostos isolados como a associação entre os mesmos apresentaram efeito quimiopreventivo durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese pelo modelo do HR, sendo que o grupo AS mostrou adição dos mecanismos em que atuam a tributirina (apoptose) e o ácido fólico (proliferação celular), porém não o sinergismo dos mesmos. Estudos complementares estão sendo realizados para melhor elucidar os mecanismos de ação destes compostos isolados bem como da associação entre os mesmos na quimioprevenção da hepatocarcinogênese.

6. Conclusões

1- A metade da dose descrita na literatura para tributirina e ácido fólico se mostrou eficaz no processo quimiopreventivo na etapa de promoção hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo do HR;
2- A associação entre tributirina e ácido fólico parece apresentar mecanismos aditivos de ambos, sendo o ácido fólico, provavelmente, o principal responsável pelo efeito quimiopreventivo pronunciado do grupo AS.

7. Referências Bibliográficas

AMES, B.N.; GOLD, L.S.; WILLETT, W.C.The causes and prevention of cancer.**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.5258-65, 1995.

ANDERSEN, J.B.; LOI, R.;PERRA, A.; FACTOR, V.M.; LEDDA-COLUMBANO, G.M.; COLUMBANO, A.; THORGEISSON, S.S. Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat.**Hepatology**, v.51, n.4, p.1401-9, 2010.

ANVISA. Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes, 2007. http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/2-rdc.pdf, 2009.

BANNASCH, P.; HAERTEL, T.; SUR, Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia.**Toxicol.Pathol.Biochem.Pharmacol.**, v.31, p.134-39, 2003.

BANNASCH, O.; ZERBAN, H. Tumors of the liver.**Pathology of Tumors in Laboratory Animals**, v.1, p.199-240, 1990.

BASHIR, O.; FITZGERALD, A.J.; GOODLAD, R.A. Both suboptimal and elevated vitamin intakes increase intestinal neoplasia and alter crypt fission in the APC mouse. **Carcinogenesis**, v.25, n.8, p.1507-15, 2004.

BAYLIN, S.B.; OHM, J.E. Epignetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction?**Nature Cancer Reviews**, v.6, p.107-116, 2006.

BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G.; GRAFF, J.R.; VERTINO, P.M.; ISSA, J.P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. **Adv. Cancer Res.**, v.72, p.141-96, 1998.

BEAUVIEUX, M.; TISSIER, P.; GIN, H.; CANIONI, P.; GALLIS, J. Butyrate impairs energy metabolism in isolated perfused liver of fed rats. **J. Nutr.**, v.131, p. 1986 – 92, 2001.

BESTOR, T.H.The DNA methyltransferases of mammals.**Hum. Mol. Genet.**, v.9, p.2395-402, 2000.

BLOOM, H.F.; SMULDERS, Y. Overview of homocysteine and folate metabolism with special references to cardiovascular disease and neural tube defects.**J. Inherit. Metab.Dis.**, v.34, p.75-81, 2011.

BOLLHEIMER, L.C.; BUETTNER, R.; KULLMANN, A.; KULLMANN, F. Folate and its preventive potential in colorectal carcinogenesis. How strong is the biological and epidemiological evidence? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.55, p. 13-36, 2003.

BOSCH, F.X.; RIBES, J.; CLÉRIES, R.; DÍAZ, M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma.**Clin Liver Dis.**, v.9, n.2, p.191-211, 2005.

CAMERON, E.E.; BACHMAN, K.E.; MYOHANEN, S.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. Synergy of demethylation nd histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. **Nat. Genet.**, v.21, p.103-107, 1999.

CANNON, G. Editor. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. **Washington (DC) 7 American Institute for Cancer Res.** Páginas 1-670, 1997.

CHAGAS, I.E.A.; BASSOLI, B.K.; SOUZA, C.A.S.; DEMINICE, R.; JUNIOR, A.A.J.; PAIVA, S.A.R.; DAGLI, M.L.Z.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. Folic acid supplementation during early hepatocarcinogenesis: cellular and molecular effects. **Global Cancer Control.**, 2011.

CHEN, Z.X.; BREITMAN, T.R. Triutyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. **Cancer Res.**, v.54, p.3493-99, 1994.

CHEN, J.; GHAZAWI, F.M.; BAKKAR, W.; LI, Q. Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B. **Mol. Cancer**, v.11, p.1-11, 2006.

CHUNG, D. Histone modification: the “next wave” in cancer therapeutics. **Trends Mol. Med.**, v.8, p.510-11, 2002.

CONLEY, B.A.; EGORIN, M.J.; TAIT, N.; ROSEN, D.M.; SAUSVILLE, E.A.; DOVER, G.; FRAM, R.J.; ECHO, D.A.V. Phase I study of the orally administered butyrate prodrug, tributyrin, in patients with solid tumors. **Clin Cancer Res.**, v.4, p.629-34, 1998.

CONTI, A.D.; KUROIWA-TRZMIELINA, J.; HORST, M.A.; BASSOLI, B.K.; CHAGAS, C.E.; PURGATTO, E.; CAVALHER, F.P.; CAMARGO, A.A.; JR, A.A.J.; VANNUCCHI, H.; SCOLASTICI, C.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. 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.**, 2011.

CORADINI, D.; BIFFI, A.; COSTA, A.; PELLIZARO, C.; PIRRONNELLO, E. Effect of sodium butyrate on human breast cancer cell lines. **Cell Prolif.**, v.30, p. 149-59, 1997.

COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes.** Manole, São Paulo, 2011.

CRAVO, M.; FIDALGO, P.; PEREIRA, A.D.; GOUVEIS-OLIVEIRA, A.; CHAVES, P.; SELHUB, J.; MASON, J.B.; MIRA, F.C.; LEITAO, C.N. DNA methylation as an intermediate biomarker in colorectal cancer: modulation by folic acid supplementation. **J. Cancer Prev.**, v.3, n. 473-9, 1994.

CUMMINGS, J.H. Short chain fatty acids in human colon.**Gut.**, v.22, p.763-79, 1981.

DAVIE, J.R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **J. Nutr.**, v.133, p.24855-935, 2003.

DEMIGNÉ, C.; YACOUB, C.; RKMCSY, C.; FAFOURNOUX, P. Propionate and butyrate metabolism in rat or sheep hepatocytes.**Biochem.Biophys.Acta.**, v.875, p.535-42, 1986.

DOLL, R. Symposium on “diet and cancer”.**Proc. Nutr. Soc.**, v.49, p.119-31, 1992.

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

DRUESNE, N.; PAGNIEZ, A.; MAYEUR, C.; THOMAS, M.; CHERBUY, C.; DUEE, P.H.; MARTEL, P.; CHAUMONTET, C. 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, 2004.

DRUMMOND, D.C.; NOBLE, C.O.; KIRPOTIN, D.B.; GUO, Z.; SCOTT, G.K.; BENZ, C.C. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.45, p. 495-528, 2005.

EDELMAN, M.J.; BAUER, K.; KHANWANI, S.; TAIT, N.; TREPEL, J.; KARP, J.; NEMIEBOKA, N.; CHUNG, E.J.; ECHO, D.V. Clinical and pharmacologic atudy of tributyrin: an oral butyrate prodrug. **Cancer Chemoter.Pharmacol.**, v.51, p. 439-44, 2003.

EGORIN, M.J.; YUAN, Z.M.; SENTZ, D.L.; PLAISANCE, K.; EISEMAN, J.L. Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. **Cancer Chemother.Pharmacol.**, v.43, p.445-53, 1999.

EIS, P.S.; TAM, W.; SUN, L.; CHADBURN, A.; LI, Z. et al. Accumulation of mir-155 and bic RNA in human b cell lymphomas. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.102, p.3627-32, 2005.

EL-SERAG, H.B.; RUDOLPH, K.L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v.132, n.7, p.2557-76, 2007.

EMMERT-BUCK, M.R.; BONNER, R.F.; SMITH, P.D.; CHUAQUI, R.F.; ZHUANG, Z.; GOLDSTEIN, S.R.; WEISS, R.A.; LLOTTA, L.A. Laser capture microdissection. **Science**, v.274, p.998-1001, 1996.

ENOMOTO, K.; FARBER, E. Kinects of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis.**Cancer Res.**, v.42, p.2330-35, 1982.

ESTELLER, M. Relevance of DNA methylation in the managementof cancer. **Lancet Oncol.**, v.4, p.351-58, 2003.

ESTELLER, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. **Hum. Mol. Genet.**, v.16, p.50-59, 2007.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **N. Engl. J. Med.**, v.358, p.1148-59, 2008.

ESTELLER, M.; ALMOUZNI, G. How epigenetics integrates nuclear functions. Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond. **EMBO**, v.6, p.624-28, 2005.

FARBER, E.The sequential analysis of liver cancer induction.**Biochem.Biophys.Acta.**, v.605, p.149-66, 1980.

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

FARBER, E. Clonal adaptation during carcinogenesis.**Annu. Rev. Pathol.**, 2007

FARBER, E.; CHEN, Z.Y.; HARRIS, L.; LEE, G.; RINAUDO, J.S.; ROOMI, W.M.; ROTSTEIN, J.; SEMPLE, E. The biochemical-molecular pathology of the stepwise development of liver cancer: new insights and problems. **In: Liver Cell Carcinoma. Falk Symposium 51. BANNASCH, P.; KEPPLER, D.; WEBER, G., eds. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers** páginas 273-91, 1988.

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

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

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

FEO, F.; PASCALE, R.M.; SIMILE, M.M.; MIGLIO, M.R.D.; MURONI, M.R.; CALVISI, D.F. Genetic alterations in liver carcinogenesis: implications for new preventive and therapeutics strategies. **Crit. Rev. Oncog.**, v.11, p.19-62, 2006.

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology.**Toxicology**, v.181-182, p.411-416, 2002.

FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. **Int. J. Cancer**, v.127, n.12, p.2893-917, 2010.

FICHLE, W.; WANG, Y.; ALLIS, C.D. Histone and chromatin cross-talk.**Curr.Opin.Cell.Biol.**, v.15, p.172-83, 2003.

FIFCH, M.D.; FLEMING, S.E. Metabolism Of short-chain fatty acids by rat colonic mucosa in vivo.**Am. J. Physio. Gastrointest.**, v.277, p. G31-G40, 1999.

FLORA, S.D.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat.Res.**, v.591, p.8-15, 2005.

FOLEY, J.; TON, T.; MARONPOT, R.; BUTTERWORTH, B.; GOLSWORTHY, T.L. Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated trhymudine as a marker of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats. **Environmental Health Perspective**, v.101, p.199-206, 1993.

FORMAN, M.R.; HURSTING, S.D.; UMAR, A.; BARRETT, J.C.A multidisciplinary perspective on human trials.**Annu. Rev. Nutr.**, v.24, p.223-54, 2004.

FRAGA, M.F.; BALLESTAR, E.; VILLAR-GAREA, A.; M.B.C. et al. Loss of acetylation in Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. **Nat. Genet.**, v.37, p.391-400, 2005.

FRANKS, L.M., KNOWLES, M.A. **What is cancer?**Oxford, 2005.

FUKS, F.; BURGERS, W.A.; BREHM, A.; HUGHES-DAVIES, L.; KOUZARIDES, T. DNA methyltransferase DNMT1 associates with histone deacetylase activity.**Nat. Genet.**, v.24, p.88-91, 2000.

FULLGRABE, J.; KAVANAGH, E.; JOSEPH, B. Histone onco-modifications.**Oncogene**, v.30, n.31, p.3391-403, 2002.

GARCEA, R.; DAINO, L.; PASCALE, R.; SIMILE, M.M.; PUDDU, M.; RUGGIU, M.E.; SADDAIU, M.A.; SATTA, G.; SEQUENZA, M.J.; FEO, F. Protoncogene methylation and expression in regenerating liver and preneoplastic liver nodules inducel

in rat by diethylnitrosamine: effects of variations of S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio. **Carcinogenesis**, v.10, p.1183-92, 1989.

GIBSON, P.R. The intracellular target of butyrate's actions: HDAC or HDON'T? **Gut**, v.46, n.4, p.447-8, 2000.

GIOIELLI, L.A. **Lipídios estruturados. Entendendo a gordura: os ácidos graxos.** Manole, São Paulo, 2002.

GOLDSWORTHY, T.L.; HANIGAN, M.H.; PITOT, H.C. Models of hepatocarcinogenesis in the rat-contrasts and comparisons.**Crit. Rev. Toxicol.**, v.17, p.61-89, 1986.

GREAVES, M. Cancer causation: the darwinian downside of past sucess? **Lancet Oncol**., v.3, p.244-51, 2002.

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

GUIL, S.; ESTELLER, M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: trying it all together. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41, p.87-95, 2009.

HAMER, H.M.; JONKERS, D.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, D.; TROOST, F.J.; BRUMMER, R.J. Review anticle: the role of butyrate on colonic function.**Aliment.Pharmacol.Ther.**, v.27, n.2, p.104-19, 2007.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-74, 2011.

HEIDOR, R.; ORTEGA, J.F.; DE CONTI, A.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. Anticarcinogenic actions of tributyrin, a butyric acid prodrug. **Curr. Drug Targets**, v.13, n.14, p.1720-9, 2012.

HERMAN, J.G. Hypermethylation of tumor supressor genes in cancer. **Semin. Cancer Biol.**, v.9, p.359-67, 1999.

HONG, W.K. General keynote: the impact of chemoprevention. **Gynecol. Oncol.**, v.88, p.S56-S58, 2003.

HONG, W.K.; SPORN, M.B. Recent advances in chemoprevention of cancer. **Science**, v.278, p. 1073-77, 1997.

HSU, S.M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry.**J. Histochem. Cytochem.**, v.29, n.11, p. 1349-53, 1981.

IARC. World cancer report 2008. http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wrc/ 2012

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

INCA. Estimativa 2012. http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/ 2012

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.256-64, 2003.

JEPPESEN, P.; TURNER, B.M. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. **Cell**, v.74; p. 280-281, 1993.

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

JONES, P.A. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat. Rev. Genet.**, v.3, p.415-428, 2002.

JONES, P.A.; BAYLIN, S.B.The epigenomics of cancer.**Cell**, v.128, p.683-92, 2007.

JONES, P.A.; VEENSTRA, G.J.; WADE, P.A.; VERMAAK, D.; KASS, S.U.; LANDSBERGER, N.; STROUBOLIS, J.; WOLFFE, A.P. Methylated DNA and meCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nat. Genet.**v.19, p.187-91, 1998.

KANAI, Y.; HIROHASHI, S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. **Carcinogenesis**, v.28, p.2434-442, 2007.

Kanao K, Mikami S, Mizuno R, Shinojima T, Murai M, Oya M. Decreased acetylation of histone H3 in renal cell carcinoma: a potential target of histone deacetylase inhibitors. **J. Urol.** v.180, p.1131-6, 2008.

KELLEHER, B.P.; O'BROIN, S.D. Microbiological assay for vitamin B12 performed in 96-well microtitre plates. **J. Clin. Pathol.**, v.44, n.7, p.592-5, 1991.

KELLEHER, B.P.; WALSHE, K.G.; SCOTT, J.M.; O'BROIN, S.D. Microbiological assay for vitamin B12 with use of a colistin-sulfate-resistant organism. **Clin.Chem.**, v.33, n.1, p.52-4, 1987.

KIM, Y.I. Role of folate in colon cancer development and progression. **J. Nutr.**, v.133, p.3731S-39, 2003.

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

KIM, Y.I. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. **Mol. Netr. Food Res.**, v.51, n.3, p.267-292, 2007.

KIM, Y.I.; BAIK, H.W.; FAWAZ, Z.; KNOX, T.; LEE, Y.M.; NORTON, R.; LIBBY, E.; MANOS, J.B. Effects of folate supplementation on two provisional molecular markers of colon cancer: a prospective, ransomizes trial. **A.J. Gastroenterol.**, v.96, p.184-95, 2001.

KIM, Y.I.; POGRIBNY, I.P.; BASNAKIAN, A.G.; MILLER, J.W.; SELHUB, J.; JAMES, J.S.; MASON, J.B. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor supressor gene. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.65, p.46-52, 1997.

KIM, Y.I.; SALOMON, R.N.; GRAEME-COOK, F.; CHOI, S.W.; SMITH, D.E.; DALLAL, G.E.; MASON, J.B. Dietary folate protects against the development of macroscopic colonic neoplasia in a dose responsive manner in rats. **Gut.**, v.39, p.732-40, 1996.

KOTSOPOULOS, J.; SOHN, K.J.; KIM, Y.I. Postweaning dietary folate deficiency provided through childhood to puberty permanently increases genomic DNA methylation in ault rat liver. **The Journal of Nutrition**, v.138, p.703-9, 2008.

KRISHNASWAMY, K.; NAIR, K.M. Importance of folate in human nutrition.**British Journal of Nutrition**, v.85, n.2, p. S115-S24, 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: patologia – bases patológicas das doenças**. Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.

KUO, C.S.; LIN, C.Y.; WU, M.Y.; LU, C.L.; HUANG, R.F. Relationship between folate status and tumor progression in patients with hepatocellular carcinoma. **Br. J. Nutr.**, v.100, n.3, p.596-602, 2008.

KUROIWA-TRZMIELINA, J.; CONTI, A.D.; SCOLASTICI, C.; PEREIRA, D.; PURGATTO, E.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: efficacy of tributyrin a butyric acid prodrug. **Int. J. Cancer**, 2008

LAI, D.T.; MACKENZIE, A.D.; O'CONNOR, C.J.; TURNER, K.W. Hidrolysis characteristics of bovine milk fat and monoacid triglycerides mediated by pregastric lipase from goats and kids. J. Dairy Sci., v.80, p.2249-57, 1997.

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

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

LEONE, G.; TEOFILI, L.; VOSO, M.T.; LUBBERT, M. DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic sindromes and secondary leukemias.**Haematologica**, v.87, p.1324-1337, 2002.

LESCHELLE, X.; DELPAL, S.; GOUBERN, M.; BLOTTIERE, H.M.; BLACHIER, F. Butyrate metabolism upstream and downstream acetyl-CoA synthesis and growth control of human colon carcinoma cells. Eur. J. Biochem., v.267, p.6435-42, 2000.

LEVIN, S.; BUCCI, T.J.; COHEN, S.M.; FIX, A.S.; HARDISTY, J.F.; LeGRAND, E.K.; MARONPOT, R.R.; TRUMP, B.F. The nomenclature of cell death: recomendations of an AD HOC committee of the society of toxicologic pathologists. **Toxicologic Pathology**, v.27, n.4, p.484-90, 1999.

LINZON, G.M.; MEDLINE, A.; SOHN, K.J.; DEPEINT, F.; CROXFORD, R.; KIM, Y.I. Effect of folic acid supplementation on the progression of colorectal aberrant crypt foci. **Carcinogenesis**, v.30, n.9, p.1536-43, 2009.

LLOVET, J.M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma.**Lancet**, v.362, p.1907-17, 2003.

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

MARKS, P.A., RICHON, V.M.; RIFKIND, R.A. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 92, n. 15, p. 1210–6, 2000.

MARKS, P.A.; RIFKIND, R.A.; RICHON, V.M.; BRESLOW, R.; MILLER, T.; KEELY, W.K. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. **Nat. Rev. Cancer**, v. 1, p.194-202, 2001.

MARRERO, J.A. Hepatocellular carcinoma. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v.21, n.3, p.308-12, 2005.

McNULTY, H.; PENTIEVA, K. Folate bioavailaby.**Proceeding of the Nutrition Society**, v.63, p.529-36, 2004.

MORENO, F.S.; RIZZI, M.B.S.L.; DAGLI, M.L.Z.; PENTEADO, M.V.C. Inhibitory effects of beta-carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar ratd by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v.12, p.1817-22, 1991.

MOTET, D.; CASTRONOVO, V. Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy. **Clin. Exp. Metastasis**, v.25, p.183-89, 2008.

NEWMARK, H.L.; YOUNG, C.W. Butyrate and phenylacetate as differentiating agents: practical problems and opportunities. **J. Cell. Biochem.**, v.22, p.247-53, 1995.

NG, H.H.; ZHANG, Y.; HENDRICH, B.; JOHNSON, C.A.; TURNER, B.B.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; REINBERG, D.; BIRD, A. Mbd2 is a transcriptional repressor belonging to the meCP1 histone deacetylase complex. **Nat. Genet.**, v.23, p.58-61, 1999.

O'BROIN, S.; KELLEHER, B. Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells.**J. Clin. Pathol.**, v.45, n.4, p.344-7, 1992.

OHASHI, K.; TSUTSUMI, M.; TSUJIUCHI, T.; KOBTSU, K.; OKAJIMA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKANO, H.; TAKAHASHI, M.; MORI, Y.; KONIshi, Y. Enhancement of n-nitrosodithylamine initiated hepatocarcinogenesis caused by a colchicine-induced cell cycle diturbance in partially hepatectomized rats. **Cancer Res.**, v.56, p.3474-79, 1996.

OHLSON, L.C.; KOROXENIDOU, L.; HALLSTROM, I.P. Inhibition od in vivo rat liver regeneration by 2-acetylaminofluorene effects the regulation of cell cycle-related proteins. **Hepatology**, v.27, n.3, p.691-6, 1998.

OLIVEIRA, V.N.; MAZZANTINI, R.P.; ONG, T.P.; JR, A.A.J.; VANNUCCHI, H.; DAGLI, M.L.Z.; MORENO, F.S. Absence of inhibitory effects of phenylacetate on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. **Int. J. Med. Environ.**, v.29, p.179-84, 2001.

OMS.Cancer ficha 297.http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/ 2012.

OMS.Relatório World Health Statistics 2006.http://www.who.int/whosis/whostat2006/en/index.html 2012

PARODI, P.W. Cow's milk fat component as potential anticarcinogenic agents.**J. Nutr.**, v.127, p.1055-60, 1997.

PASCALE, R.M.; DEMIGLIO, M.; MURONI, M.R.; SIMILE, M.M.; DAINO, L. et al. C-MYC amplification in pre-malignant and malignant lesions induced in rat liver by resistant hepatocyte model. **Int. J. Cancer.**, v.68, p. 136-42, 1996.

PASCALE, R.M.; SIMILE, M.M.; DEMIGLIO, M.R.; FEO, F. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis: S-adenosyl-L-methionine. **Alcohol**, v.27, p.1993-8, 2002.

PATRA, S.K.; PATRA, A.; RIZZI, F.; GHOSH, T.C.; BETTUZZI, S. Demethylation of (cytosine-5-c-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development. **Cancer Metastasis Rev.**, v.27, p.315-34, 2008.

P.C.G. et al.; Effect of a necrogenic dose of diethylnitrosamine on vitamin E-deficient an vitamin E-supplemented rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.929-35, 1998.

PITOT, H.C. Adventures in hepatocarcinogenesis.**Annu. Rev. Pathol.**, 2007

PITOT, H.C. Pathway of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**, v.358, p. 859-60, 2011.

PLANCHON, P.; RAUX, H.; MAGNIEN, V.; RONCO, G.; VILLA, P, et al. New stable butyrate derivatives alter proliferation and differentiation in human mammary cells. **Int. J. Cancer**, v.48, p.443-449, 1991.

POGRIBNY, I.P.; BASNAKIAN, A.G.; MILLER, B.J.; LOPATINA, N.G.; PORIER, L.A.; JAMES, S.J. Breaks in genomic DNA and within p53 gene are associated with hypomethilation in livers of folate/methyl-deficient rat. **Cancer Res.**, v.55, p.1984-901, 1995.

POGRIBNY, I.P.; JAMES, S.J.; JERNIGAN, S.; POGRIBNA, M. Genomic hypomethylation is specific for preneoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. **Mutat.Res.**, v.548, p.53-59, 2004.

POGRIBNY, I.P.; RUSYN, I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma.**Cancer Lett.**, 2012

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

PUFULETTE, M.; AL-GHNANIEM, R.; APPLEBY, A.; HARRIS, N.; GOUT, S.; EMERY, P.W.; SANDERS, T.A. Effect of folic acid supplementation on genomic DNA methylation in patients with colorectal adenoma. **Get.**, v.54, p.648-53, 2005.

ROBERTSON, K.D., JONES, P.A. DNA methylation: past, present and future directions. **Carcinogenesis**, v.21, p. 461-67, 2000.

ROOMI, M.W.; KO, R.H.; SARMA, D.S.R.; FARBER, E.A common biochemical pattern in preneoplastic hepatocyte nodules generated in four different models in the rat.**Cancer Res.**, v.45, p. 564-71, 1985.

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

ROSS, S.A. Nutritional genomic approaches to cancer prevention research.**Exp. Oncol.**, v.29, p.250-56, 2007.

SALMINEM, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M.C.; CUMMINGS, J.H.; FRANCK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.C.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Br. J. Nutr.**, v.80, p. S147-S71, 1998.

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

SCHEPPACH, W.; BARTRAM, P.; RICHTER, A.; RICHTER, F.; LIEPOLD, H.; DUSEL, G.; HOFSTETTER, G.; RUTHELEIN, J.; KASPER, H. Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. **JPEN: J. Parenter. Enteral.Nutr.**, v.16, p.43-48, 1992.

SCHULTE-HERMANN, R.; TIMMERMANN-TROSIENER, I.; BARTHEL, G.; BURSCH, W. DNA synthesis, apoptosis, and phenotipic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. **Cancer Res.**, v.50, p.5127-35, 1990.

SEMPLE-ROBERTS, E.; HAYES, M.A.; ARMSTRONG, D.; BECKER, R.A.; RACZ, W.J.; FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **Int. J. Cancer**, v.40, p.643-45, 1987.

SIMILE, M.M.; SAVIOZZI, M.; DEMIGLIO, M.R.; MURONI, M.R.; NUFRIS, A.; PASCALE, R.M.; MALVALDI, G.; FEO, F. Persistant chemopreventive effect of S-adenosyl-L-methionine on the development of liver putative preneoplastic lesions induced by thibenzamide in diethylnitrosamine-initiated rats. **Carcinogenesis**, v.19, p.1533-7, 1996.

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

SOHN, K.J.; STEMPAK, J.M.; REID, S.; SHIRWADKAR, S.; MASON, J.B.; KIM, W.I.The effect of dietary folate on genomic and p53 specific DNA methylation in rat colon.**Carcinogenesis**, v.24, n.1, p.81-90, 2003.

SONG, J.; SOHN, K.J.; MEDLINE, A.; ASH, C.; GALLINGER, S.; KIM, Y.I. Chemopreventive effects of dietary folate on intestinal polyps in APC/MSH/mice. **Cancer Research**, v.60, p.3191-99, 2000.

SPORN, M.B.; DUNLOP, N.M.; NEWTON, D.L.; SMITH, J.M. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Fed.Proc**., v.35, p.1332-38, 1976.

SPORN, M.B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controling cancer. **Nature Rev.**, v.2, p.537-743, 2002.

STANGER, O. Physiology of folic acid in health and disease. **Current Drug Metabolism.**, v.3, p.211-23, 2002.

STRAHL, B.D.; ALLIS, C.D.The language of covalent histone modifications.**Nature**, v.403, p.41-45, 2000.

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

TING, A.H.; McGARVEY, K.M.; BAYLIN, S.B.The cancer epigenome – components and functional correlates.**Genes Dev.**, v.20, p. 3215-323, 2006.

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

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

THUN, M.J.; DeLANCEY, J.O.; Center, M.M.; JEMAL, A.; WARD, E.M. The global burden of cancer: priorities for prevention. **Carcinogenesis**, v.31, n.1, p.100-10, 2010.

TROSKO, J.E. The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy.**Biomed.Pharmacother.**, v.59, p.S326-S31, 2005.

ULRICH, C.M. Nutrigenomics in cancer research – folate metabolism and colorectal cancer. **J. Nutr.**, v.135, p.2698-702, 2005.

ULRICH, C.M.; POTTER, J.D. Folate supplementation: too much of a good thing. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.15, n.2, p.189-93, 2006.

UMEZAWA, A.; YAMAMOTO, H.; RODEES, K.; KLEMSZ, M.J. Methylation of an ets side in the intron enhancer of the keratin 18 gene participates in tissue-specific repression. **Mol. Cell. Biol.**, v.17, p.4885-94, 1997.

USHIJIMA, T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. **Nat. Rev. Cancer**, v.5, p.223-31, 2005.

VALERI, N.; VANNINI, I.; FANINI, F.; CALORE, F.; ADAIR, B.; FABBRI, M. Epigenetics, miRNAs, and human cancer: a new chapter in human gene regulation. **Mamm.Genome**, v.20, p.573-80, 2009.

VEECK, J.; ESTELLER, M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia**, v.15, p.5-17, 2010.

W.C.R.F.I. for Cancer. In: Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. **Patterns of cancer**, 1997.

WATKINS, S.M.; CARTER, L.C.; MAK, J.; TSAU, J.; YAMAMOTO, S.; GERMAN, B. Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumor cells. **J. Dairy Res.**, v.66, p.559-67, 1999.

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

WADE, P.A. Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. **Oncogene**, v.20, p.3166-73, 2001.

WEI, Z.L.; ZHAO, Q.L.; YU, D. Y.; HASSAN, M.A.; KONDO, T. Enhancement of sodium butyrate-induced cell death by hyperthermia in HCT 116 human colorectal cancer cells. **Anticancer Res.**, v.28, p.1693-700, 2008.

WEISBURGER, J.H. Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future.**Mutat.Res.**, v.23-25, p.480-81, 2001.

WILKINSON, E. World cancer report.**Lancet Oncology**, v.4, p.321, 2003.

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, p.107-115, 2003.

WOLFFE, A.P.; PRUSS, D. Targeting chromatin disruption: transcriptional regulators that acetylate histones. **Cell**, v.84, p.817-19, 1996.

WORM, J., GULDBERG, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. **J. Oral. Pathol.Med.**, v.31, 0.443-449, 2002.

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

YOUNG, M.R.; YANG, H.S.; COLBURN, N.H. Promising molecular targets for cancer prevention: Ap-1, NkκB and PDCD4. **Trends Mol. Med.**, v.9, p.36-41, 2003.

YU, M.C.; YUAN, J.M. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma.**Gastroenterology**, v.127 (5 Suppl 1), p.72-8, 2004.

8. Anexo 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/80/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **""Atividade Quimiopreventiva da Tributirina e do Ácido Fólico Quando Administradas Isoladamente e/ou em Combinação com a Etapa de Promoção da Hepatocarcinogênese em Ratos Wistar""** (Protocolo CEUA/FCF/320), de responsabilidade da pesquisadora **Aline Henriques** sob a orientação do 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 05 de setembro de 2011.

São Paulo, 06 de setembro de 2011.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br