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

Redução das células ovais hepáticas pelo quimiopreventivo β-ionona na etapa de promoção da hepatocarcinogênese induzida em ratos Wistar pelo modelo do Hepatócito Resistente

Adriana Campos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE
Orientador:
Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2012

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

Redução das células ovais hepáticas pelo quimiopreventivo β-ionona na etapa de promoção da hepatocarcinogênese induzida em ratos Wistar pelo modelo do Hepatócito Resistente

Adriana Campos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE
Orientador:
Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2012

Adriana Campos

Redução das células ovais hepáticas pelo quimiopreventivo β-ionona na etapa de promoção da hepatocarcinogênese induzida em ratos Wistar pelo modelo do Hepatócito Resistente

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedicatória

Aos meus pais Aluízio e Rejane, por todo

apoio, incentivo, carinho e amor.

A vocês devo tudo que sou hoje.

Agradecimentos

A Deus!

Ao Professor Fernando Salvador Moreno, por todos os ensinamentos, apoio e paciência que sempre me dedicou nestes anos. Admiro sua inteligência, competência e seu dom profissional.

Aos meus pais Aluízio e Rejane, por todo carinho e incentivo. Mesmo com a distância, o apoio e o amor de vocês foi essencial durante esta trajetória e esta conquista.

Aos membros da banca de qualificação, Professor Thomas Prates Ong, Professor Luis Fernando Barbisan e Aline de Conti pelas críticas e contribuições para conclusão deste trabalho.

À professora Maria Lúcia Zaidan Dagli, por sua gentileza e disposição em me ensinar técnicas novas.

Às amigas Mônica Testoni Cardozo, Kelly Silva Furtado e Aline de Conti, pelas colaborações e ensinamentos. A alegria, sabedoria e amor pela pesquisa de vocês me motivaram a continuar nesta área tão bonita e me fizeram crescer tanto profissional quanto pessoalmente.

Ao Renato Heidor, por sua paciência e dedicação, sempre nos ajudando com sua sabedoria e como técnico do laboratório.

Aos meus colegas do laboratório Dieta, Nutrição e Câncer, que se tornaram minha família aqui em São Paulo, Aline, Camile, Eduardo, Fábia, Juliana Miranda, Juliana Ortega, Laura, Luiza e Mariana. Obrigado a todos a vocês pelo apoio e amizade, dentro e fora do laboratório!

À agências de fomento: CAPES, pela concessão da minha bolsa e CNPQ e FAPESP, pelo auxílio financeiro ao laboratório.

RESUMO

Campos, A. **Redução das células ovais hepáticas pelo quimiopreventivo β-ionona na etapa de promoção da hepatocarcinogênese induzida em ratos Wistar pelo modelo do Hepatócito Resistente.** 2012. 65f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A carcinogênese é um processo longo que envolve múltiplas etapas na transformação das células normais em malignas. Duas hipóteses têm sido propostas para explicar o potencial heterogêneo de células neoplásicas e o processo de desenvolvimento de neoplasias: o modelo estocástico, em que uma população distinta de células neoplásicas adquire um conjunto de mutações somáticas e desenvolve capacidade metastática e o modelo hierárquico, no qual neoplasias primárias e suas metástases são iniciadas por um número pequeno de células, conhecidas "*cancer stem cells*" (CSC). Assim, o HCC poder ser originado de células tronco/progenitoras hepáticas ou células ovais e hepatócitos. Aventou-se a hipótese neste trabalho que a BI reduz o número de células ovais hepáticas, regulando proteínas (CK19, β-catenina e ALDH1A1) que possam estar relacionadas ao papel destas células na hepatocarcinogênese. Ratos Wistar foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente" e receberam durante 4 semanas consecutivas: 16mg/100g p.c. de β-ionona (BI) ou somente 0,25mL/100g p.c. de óleo de milho (grupo controle - OM). Estes animais foram distribuídos em 4 pontos de eutanásia (P0, P1, P2 e P3 - 7, 14, 21 e 35 dias após a HP respectivamente), para avaliação da cinética das células ovais hepáticas. Foi observado que o tratamento com BI diminuiu a presença de células ovais GST-P positivas e reduziu o percentual de LPN positivas para ALDH1A1, β-catenina e CK19 quando comparado ao do respectivo grupo controle OM.

Em conclusão, o tratamento com BI reduziu o número das células ovais, bem como os níveis de proteínas a elas relacionadas e que conferem ao HCC mau prognóstico e maior agressividade.

Palavras-chave: hepatocarcinogênese, quimioprevenção, β-ionona, células ovais.

ABSTRACT

Campos, A. **Reduction of hepatic oval cells by the chemopreventive β-ionone in the promotion phase of hepatocarcinogenesis induced in Wistar rats by the Resistent Hepatocyte.** 2012. 65p. Master's degree dissertation – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2012.

Carcinogenesis is a long process that involves multiple phases in the transformation of normal cells into malignant. Two hypotheses have been proposed to explain the heterogeneous potential of neoplastic cells and the process of carcinogenesis: a stochastic model in which a distinct population of neoplastic cells acquires a set of somatic mutations and develops metastatic capacity and hierarchical model in which the primary tumors and their metastases are initiated by a small number of cells, known "cancer stem cells" (CSC). Therefore, the HCC can be originate from stem/progenitor cells or hepatic oval cells and hepatocytes. Ventured the hypothesis in this work that β-ionone (BI) reduces the number of hepatic oval cells, regulating proteins (CK19, β-catenin and ALDH1A1) that may be related to the role of these cells in hepatocarcinogenesis. Wistar rats were submitted to hepatocarcinogenesis model of "Resistant Hepatocyte" and received for 4 consecutive weeks: 16mg/100g body weight of BI or 0,25 mL/100g body weight of corn oil (control group - CO). These animals were euthanized at 4 points (P0, P1, P2 and P3 - 7, 14, 21 and 35 days after PH, respectively) to evaluate the kinetics of hepatic oval cells. It was observed that the treatment of BI decreased the presence of GST-P oval cells positive and reduced the percentage of positive ALDH1A1 LPN, β-catenin and CK19 compared to the respective control group OM. In conclusion, the treatment with BI reduced the number of oval cells as well as the levels of proteins related to them and gives a poor prognosis in HCC and increased aggressiveness.

Key-words: hepatocarcinogenesis, chemoprevention, β-ionone, oval cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via resumida do mevalonato.....**26**

Figura 2. Estrutura química do isoprenóide cíclico β-ionona.....**27**

Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental.....**33**

Figura 4. Corte histológico de lesões pré-neoplásicas GST-P positivas em fígado de rato Wistar submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. (a) Lesão pré-neoplásica persistentes; (b) Lesão pré-neoplásica em remodelação.....**38**

Figura 5. Fração volumétrica (%) de células ovais GST-P positivas em zonas periportais de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.....**40**

Figura 6. Percentual de LPN positivas de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese para β-catenina no Ponto 0 (P0 = 7 dias após a HP; sem tratamento).....**43**

Figura 7. Percentual de LPN positivas de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese para β-catenina no Ponto 1 (P1 = 14 dias após a HP; 1 semana de tratamento).....**44**

Figura 8. Percentual de LPN positivas de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese para β-catenina no Ponto 2 (P2 = 21 dias após a HP; 2 semanas de tratamento).....**45**

Figura 9. Percentual de LPN positivas de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese para β-catenina no Ponto 3 (P3 = 35 dias após a HP; 4 semanas de tratamento).....**46**

Figura 10. Imagens representativas de: A) Pontos de intersecção de região periportal apresentando células ovais GST-P positivas (seta); B, C e D) Marcação imunoistoquímica para CK19, β-catenina e ALDH1A1, respectivamente.....**48**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos primários utilizados na reação de imunoistoquímica para GST-P, CK19, β-catenina e ALDH1A1.....**35**

Tabela 2. Lesões GST-P positivas de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona e óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.....**39**

Tabela 3. Percentual de LPN positivas para CK19 no citoplasma de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese. **41**

Tabela 4. Percentual de LPN positivas para ALDH1A1 no citoplasma de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese. **47**

LISTA DE ABREVIAÇÕES

2-AAF = 2-acetilaminofluoreno

ALDH = Aldeído desidrogenase

ALDH1A1 = Aldeído desidrogenase 1A1

BI = β-ionona

CBA = Composto bioativo de alimentos

CK19 = Citoqueratina 19

CSC = Células tronco neoplásicas (do termo inglês *Cancer stem cells*)

DEN = Dietilnitrosamina

GST-P Glutationa S-transferase forma placentária

HBV = Vírus da Hepatite B

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

HCV = Vírus da Hepatite C

HP = Hepatectomia Parcial

INCA = Instituto Nacional do Câncer

LPN = Lesões pré-neoplásicas

NASH = Esteatohepatite não alcoólica

OM = Óleo de Milho

OMS = Organização Mundial da Saúde

pLPN = Lesões pré-neoplásicas persistentes

P0, P1, P2 e P3 = Pontos de eutanásia após 7, 14, 21e 35 dias da HP, respectivamente

RH = Hepatócito Resistente (do termo inglês *Resistant Hepacyte*)

rLPN = Lesões pré-neoplásicas em remodelação

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA 13

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS 13

1.2 HEPATOCARCINOGÊNESE 14

1.3 O MODELO DO HEPATÓCITO RESISTENTE (RH) 20

1.4 DIETA, NUTRIÇÃO E CÂNCER 23

1.5 QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER COM B-IONONA 24

2. OBJETIVOS 29

2.1 GERAL 29

2.2 ESPECÍFICOS 29

3. MATERIAL E MÉTODOS 30

3.1 ANIMAIS 30

3.2 MODELO DE HEPATOCARCINOGÊNESE DO "HEPATÓCITO RESISTENTE" 31

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 32

3.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS 33

3.5 MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA GST-P, CK19,B-CATENINA E ALDH1A1 34

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE LPN GST-P POSITIVAS 35

3.7 FREQUÊNCIA DOS MARCADORES CK19, B-CATENINA E ALDH1A1 EM LPN POSITIVAS PARA GST-P 36

3.8 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS OVAIS 36

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 37

4. RESULTADOS **38**

4.1 ANÁLISE DE LPN GST-P POSITIVAS 38

4.2 QUATIFICAÇÃO DAS CÉLULAS OVAIS 40

4.3 PERCENTUAL DE LPN POSITIVAS PARA CK19 41

4.4 PERCENTUAL DE LPN POSITIVAS PARA B-CATENINA 42

4.5 PERCENTUAL DE LPN POSITIVAS PARA ALDH1A1 46

5. DISCUSSÃO **49**

6. CONCLUSÃO **55**

7. REFERÊNCIAS **56**

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aspectos Epidemiológicos

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. Segundo recente relatório da Organização Mundial da Saúde em parceria com a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos (BOYLE; LEVIN, 2008; WHO, 2009).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) informou em nota que mais de 12, 7 milhões de pessoas são diagnosticadas todo ano com câncer e 7,6 milhões de pessoas morrem vítimas da doença. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (INCA, 2012).

No Brasil, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida. As estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer (INCA, 2012).

Considerando-se este grande número de casos novos de cânceres no país e as diferenças na incidência dessa doença no mundo, o desenvolvimento de estratégias quimiopreventivas utilizando-se compostos presentes em alimentos pode apresentar grande impacto tanto na ciência médica como na economia mundial (AGGARWALL; SHISHODIA, 2006; RIBEIRO et al., 2006).

Dentre os cânceres mais comuns, o carcinoma hepatocelular (HCC) é o 5º mais frequente em todo mundo e a 3ª causa mais comum de mortalidade por câncer, além de apresentar mau prognóstico e reduzido índice de sobrevida (MOTOLA-KUBA et al., 2006; EL-SERAG; RUDOLPH, 2007). No Brasil, o HCC ocupa a 9ª posição em mortalidade e, aproximadamente, ocorrem 9000 casos novos e 8900 mortes anualmente pelo mesmo (FERLAY et al., 2010; INCA, 2012).

A frequência do HCC apresenta grandes diferenças na população em virtude de diversos fatores de risco ambientais e/ou genéticos envolvidos na patogênese da doença. As infecções pelos vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV) consistem na etiologia predominante do câncer primário de fígado. Outros fatores de risco incluem a ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas, consumo crônico de bebidas alcoólicas, uso de tabaco, hemocromatose, esteatose, radiação, esteatohepatite não alcoólica (NASH) e a exposição a substâncias químicas como N-nitrosaminas e compostos N-nitrosos (CHEN; YU; LIAW, 1997; LLOVET; BURROUGHS; BRUIX, 2003; EL-SERAG, 2012). Estes fatores são conhecidos por gerarem modificações químicas nas bases do DNA, como ligações covalentes dos carcinógenos ao DNA (formação de adutos), oxidação de bases ou erro no reparo do DNA. Todas estas alterações levam a mutações em genes específicos, alguns dos quais críticos para o estabelecimento de neoplasias em animais e humanos (LIM, 2002).

1.2 Hepatocarcinogênese

O desenvolvimento de neoplasias, ou seja, o processo de carcinogênese, está associado ao acúmulo de alterações no genoma de uma célula, que ocorre espontaneamente ou por ação de agentes exógenos (IRIGARAY, BELPOMME, 2010). Este processo é longo e envolve múltiplas

etapas, como iniciação, promoção e progressão, na transformação das células normais em malignas (FARBER, 1990; PITOT, 2007).

Na etapa de iniciação ocorre alteração irreversível no material genético (DNA), que pode acarretar mutação. Esta alteração no DNA é gerada por um composto genotóxico, que provoca danos genéticos passíveis de serem transmitidos para as células-filhas, mas compatíveis com a sobrevida da célula (PITOT, 2007).

A etapa de promoção é caracterizada pela proliferação celular, que contribui com a expansão clonal das células iniciadas, pela ação de um agente promotor, formando assim lesões pré-neoplásicas (LPN). Ou seja, na promoção ocorre a conversão da célula iniciada em célula pré-maligna. Este estágio é reversível, apresenta grande período de latência e representa o principal alvo da ação de agentes quimiopreventivos (PITOT, 2001; PITOT, 2007).

A progressão da célula pré-neoplásica em maligna ocorre por divisão celular incontrolada, perda da estabilidade genética, amplificações e deleções gênicas. Além disso, é irreversível (PITOT, 2007).

A formação de LPN pode ocorrer por meio de mecanismos endógenos intrínsecos ou via agentes exógenos. Os fatores endógenos que atuam no estágio da promoção incluem, por exemplo, hormônios e fatores de crescimento. Agentes exógenos incluem uma variedade de compostos químicos e físicos capazes de induzir a proliferação das células iniciadas (PITOT; DRAGAN, 1991; PITOT, 1996; KLAUNING; KLAMENDULIS; XU, 2000; YOUNG; YANG; COLBURN, 2003).

As LPNs podem ser identificadas por meio da expressão alterada de enzimas hepáticas, como menor expressão de enzimas de fase I e maior indução de enzimas de fase II de biotransformação (FEO et al., 2006). Em ratos, as células iniciadas podem ser identificadas em estágios iniciais por meio de marcação para as enzimas γ-glutamiltranspeptidase (γ-GT) ou

glutationa *S*-transferase (GST) na forma placentária (GST-P) (MORIMURA et al., 1993; HIGASHI et al., 2004; FEO et al., 2006).

O desenvolvimento de neoplasias envolve a expansão clonal de células com alterações bioquímicas e genéticas adicionais, relacionadas com taxa de proliferação celular aumentada e caráter invasivo, sendo, portanto, correspondente ao estágio da progressão da carcinogênese (PITOT; DRAGAN, 1991; YOUNG; YANG; COLBURN, 2003; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004; LIBBRECHT; DESMET; ROSKAMS, 2005).

Em células pré-neoplásicas ou neoplásicas, a morte celular programada (apoptose) pode representar um mecanismo protetor contra o desenvolvimento de neoplasias por meio da eliminação das células com danos genéticos ou das que iniciaram a proliferação (KONG et al., 2001).

Sendo o câncer uma doença complexa que resulta de alterações simultâneas em genes geralmente relacionados à proliferação e à morte celular, considera-se estes eventos críticos no desenvolvimento da carcinogênese (KANUNFRE, 2004; PARMIGIANI; CAMARGO, 2004; FEO et al., 2006).

Diversas observações demonstram a existência de uma relação evolutiva entre LPN e neoplasias malignas hepáticas (FARBER, SARMA, 1987).

Cerca de 95-98%, das LPN regridem e não evoluem para o câncer, sofrendo “remodelação” (LPN em remodelação - rLPN), um processo altamente complexo que envolve mudanças no suprimento sanguíneo e em características bioquímicas, bem como da estrutura e arquitetura celulares, para que retorne ao aspecto “normal” anterior do fígado. As LPNs restantes (2-5%) seguem a persistência (LPN persistentes – pLPN), adquirem a capacidade de crescimento autônomo e progridem para adenomas e HCC (HIGASHI et al., 2004; FEO et al., 2006). Entretanto, uma pequena parte das pLPN apresenta o mesmo padrão bioquímico observado na

maioria das lesões que sofrem remodelação, sendo o processo muito mais lento. Não foram encontradas evidências de que lesões que remodelam e aquelas que persistem representem, na verdade, duas respostas inteiramente diferentes à ação de carcinógenos (FARBER; SARMA, 1987; FARBER, 1990).

Acredita-se que a remodelação de LPN possa envolver a rediferenciação dos nódulos dos hepatócitos para um fenótipo semelhante ao do tecido normal, ou até mesmo a morte das células e remodelação dos mesmos (TATEMATSU; NAGAMINE; FARBER, 1983; FARBER et al., 1988; FEO et al., 2006). Acredita-se, ainda, que a persistência dos nódulos possa indicar um bloqueio na diferenciação celular ou na apoptose, podendo estar relacionada com maior tendência de evolução para os HCCs (FARBER et al., 1988; FARBER; RUBIN, 1991; OHASHI et al., 1996; DE MIGLIO et al., 2003).

Duas hipóteses têm sido propostas para explicar o potencial heterogêneo de células neoplásicas e o processo de desenvolvimento de neoplasias: o modelo estocástico, em que uma população distinta de células neoplásicas adquire um conjunto de mutações somáticas e desenvolve a capacidade metastática; e o modelo hierárquico, no qual neoplasias primárias e suas metástases são iniciadas por um número pequeno de células, conhecidas como células tronco neoplásicas ou "*cancer stem cells*" (CSC) - (ODOUX et al., 2008; ARAVALLI et al., 2010).

A idéia de que as células progenitoras hepáticas podem conduzir à hepatocarcinogênese e ser uma fonte de CSC é bem documentada historicamente. A ativação e proliferação destas células tem sido relatada em muitas condições pré-neoplásicas. Estudos já demonstraram que as CSC exibem muitas propriedades clássicas tanto das células tronco normais como de células neoplásicas, incluindo a alta capacidade de auto-renovação, aptidão de auto-proteção contra os fármacos, toxinas e radiação, e a capacidade para iniciar e sustentar o crescimento neoplásico. Na última década, essas células foram identificadas em doenças hematológicas malignas e, mais

recentemente, em neoplasias sólidas que incluem o fígado, mama, próstata, cérebro e cólon (MISHRA et al., 2009; MARQUARDT; THORGEIRSSOM, 2010; TONG; MA; GUAN, 2011).

O fígado é o único órgão sólido no organismo com a capacidade de regeneração como resposta à lesão. Se os hepatócitos são impedidos de iniciar esta regeneração, ou a lesão é muito grave, como a hepatectomia parcial, um compartimento reserva é ativado, chamado de compartimento de células tronco/progenitoras (dando origem às células ovais), encontrados nos menores ramos periféricos da árvore biliar, conhecido como Canais de Hering. Estas células podem se diferenciar em hepatócitos e células epiteliais dos ductos biliares (colangiócitos) bem como dar origem ao câncer hepático (ROSKAMS, 2008; MISHRA et al., 2009; DARWICHE et al., 2011; OISHI; WANG, 2011).

De acordo com o modelo de CSC, a aplicação de uma variedade de protocolos experimentais em roedores resultou na ativação de células ovais. Sugere-se que estas sejam resistentes a carcinógenos que, por sua vez, são citotóxicos (citostático ou necrosante) para os hepatócitos diferenciados, induzindo uma resposta regenerativa crônica das células progenitoras, bem como das precursoras intermediárias dos hepatócitos maduros, responsivas ao estímulo proliferativo. Este estado proliferativo crônico favoreceria a transformação destas células imaturas, que interromperiam o processo de diferenciação em curso e se tornariam potencialmente neoplásicas. (NAVES; MORENO, 2000; MARQUARDT; THORGEIRSSOM, 2010). Assim, o HCC pode ser originado de células tronco/progenitoras hepáticas ou células ovais e hepatócitos.

Após a transformação maligna, um número substancial de HCC demonstrou características “bipotenciais”: células neoplásicas expressando marcadores biliares e hepáticos, como a citoqueratina 19 (CK19), citoqueratina 17 (CK17), alfafetoproteína (AFP), albumina e OV-6 (MARQUARDT; THORGEIRSSOM, 2010; DARWICHE et al., 2011). Marquardt e

Thorgeissom (2010) relataram que a presença desses marcadores se encontrava associada a um fenótipo mais agressivo e pior prognóstico clínico.

As citoqueratinas constituem o citoesqueleto dos filamentos intermediários da maioria das células epiteliais hepáticas. No fígado adulto normal, os hepatócitos contem apenas CK18 e CK8, enquanto as células epiteliais da árvore biliar humana expressam CK19 e CK17. No entanto, diversos estudos relataram a presença de CK19 no HCC, podendo este evento ser resultado da desdiferenciação dos hepatócitos maduros para um fenótipo de células progenitoras/ductulares ou do processo de proliferação das células ovais. Especificamente, HCC que expressam CK19 apresentam maior agressividade, sugerindo que a CK19 pode ser um potencial marcador de prognóstico para HCC (SU et al., 2003; DURNEZ et al., 2006; ADERSERN et al., 2010).

Evidências recentes indicam que a β-catenina desempenha papel crucial no desenvolvimento tecidual por meio da regulação da proliferação das células ovais hepáticas em roedores e da diferenciação celular. Sendo assim, seu acúmulo parece estar envolvido na patogênese de neoplasias hepáticas como o HCC. Observou-se que entre 33 a 67% dos HCC apresentam alta concentração de β-catenina no citoplasma e no núcleo, enquanto no tecido normal não foi encontrado indício da mesma (APTE et al., 2008; YANG et al., 2008; WEI et al., 2009). Dessa forma, a implicação da β-catenina em adenomas hepáticos e no HCC pode ser considerada um mediador das CSC.

Além disso, um importante marcador de células-tronco, identificado em vários tecidos como a medula óssea, cérebro e mama, é a enzima aldeído desidrogenase 1A1 (ALDH1A1). Esta foi encontrada hiperexpressa em células tronco/progenitoras, e é importante para várias atividades biológicas, incluindo resistência a fármacos, diferenciação celular e resposta ao estresse oxidativo. Recentemente, a atividade da ALDH tem recebido considerável atenção como estratégia valiosa para isolar células tronco normais ou neoplásicas e por ter um papel crucial na

quimiorresistência das CSC, atuando na desintoxicação de substâncias nocivas às células-tronco, como aldeídos (MA et al., 2008; MOREB, 2008; DOLLÉ et al., 2011).

Com base no que foi exposto, o conhecimento de possíveis marcadores da diferenciação e proliferação de células ovais é de grande importância para obtenção de novas formas de quimioprevenção. As estratégias para a identificação de novos marcadores devem incluir a descoberta de alterações moleculares nos estágios iniciais da carcinogênese hepática, relevantes para a progressão das LPNs para a malignidade. Isso pode ser feito em modelos de roedores, e deve ser seguido na avaliação funcional de novos marcadores e alvos em HCC humanos (FRAU et al., 2010).

Dentre os modelos utilizados, destacam-se trabalhos realizados com ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do Hepatócito Resistente, desenvolvido por Solt e Farber (1976).

1.3 O modelo do Hepatócito Resistente (RH)

O padrão do desenvolvimento de neoplasias de fígado em ratos é semelhante ao que se observa em humanos (ANDERSEN et al., 2010). Já foram encontradas semelhanças morfológicas, bioquímicas e biológicas em LPN e neoplasias hepáticas em humanos e roedores. 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 similares (FARBER; SARMA, 1987; BANNASCH; HAERTEL; SU, 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*.

Um modelo classicamente utilizado para o estudo da hepatocarcinogênese em ratos é o do

Hepatócito Resistente (RH) descrito em 1976 (SOLT; FARBER, 1976) e modificado em 1987 (SEMPLE-ROBERTS et al., 1987). 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, FARMA 1987; OLIVEIRA et al., 2001). Outra característica positiva deste modelo é a possibilidade de se distinguir a reduzida incidência de pLPN do grande número de pela marcação com a GST-P ou com a γGT (FEO et al., 2006).

Este modelo consiste na administração única de um agente iniciador, no caso a dietilnitrosamina (DEN), 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, os animais 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 (SOLT; FARBER, 1976; SEMPLE-ROBERTS et al., 1987).

A DEN é um potente agente iniciante frequentemente utilizado em estudos de carcinogênese experimental e sua carcinogenicidade é relacionada à capacidade de alquilar a estrutura do DNA (HEINDRYCKX; COLLE; VLIERBERGHE, 2009). 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 (CHIARELLO 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 normais mas

não aos iniciados pela DEN, os quais se proliferam e dão origem às lesões pré-neoplásicas (TRAVIS; BELEFANT, 1992).

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

Em diversos protocolos de hepatocarcinogênese a proliferação dos hepatócitos em 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 RH 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).

Estudo realizado em ratos submetidos ao modelo do Hepatócito Resisente (RH), demonstrou que o HCC neste modelo é derivado de células progenitoras, sendo a CK19 um marcador de mau prognóstico dessas lesões desde seu estágio pré-neoplásico até o desenvolvimento do HCC (ANDERSEN et al., 2010).

Nesse contexto, é de grande relevância a busca de substâncias capazes de modular a formação de LPN e a diferenciação celular, de forma a prevenir, retardar ou reverter o estágio de promoção da hepatocarcinogênese.

1.4 Dieta, Nutrição e Câncer

Foram encontradas evidências de que a alimentação tem um papel fundamental na modulação de todos os estágios da carcinogênese, destacando-se entre outros fatores de risco. Acredita-se que uma dieta adequada poderia prevenir de três a quatro milhões de casos novos de neoplasias a cada ano. Assim, pode-se observar a influência negativa da incorporação da dieta ocidental moderna (ingestão de gordura e alimentos processados aumentados e consumo de fibras reduzido), no desenvolvimento das diversas formas de câncer nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (GLANZ, 1997; GAROFOLO et al., 2004).

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 sistema imunitário (DOLL; PETO, 1981).

Grande número de estudos epidemiológicos tem demonstrado uma associação entre o consumo de frutas e hortaliças e a diminuição do risco de vários tipos de câncer. Vários compostos naturais alimentares vêm recebendo atenção por sua eficácia na quimioprevenção do câncer (LI et al., 2011) .

Em 1997, a World Cancer Research Foundation e o American Institute for Cancer Research, ressaltaram que a incidência de neoplasias malignas no mundo pode ser reduzida em 30-40%, por meio de modificações alimentares e em determinados estilos de vida. Essas organizações estipularam, ainda, em 2001, que a ingestão diária de no mínimo 400 a 600 g de frutas e hortaliças reduz a incidência de uma variedade de neoplasias malignas em no mínimo

20%, desde que implementada por um período prolongado (NOWELL; AHN; AMBROSNE, 2004).

Publicação recente da OMS 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 HCV e pelo *Helicobacter pylori* (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 do câncer com β-ionona

Uma das observações mais importantes provenientes dos estudos com modelos de hepatocarcinogênese em animais é que nutrientes e CBAs podem modular o desenvolvimento do HCC. Dessa forma, pode-se definir a quimioprevenção do câncer como a utilização de compostos químicos naturais ou sintéticos com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de desenvolvimento de neoplasias (SHUKLA; KALRA 2007).

O termo quimioprevenção foi utilizado pela primeira vez por Michael Sporn, em 1976, como uma forma de se prevenir a doença por meio da administração de um ou mais compostos químicos durante as etapas iniciais pré-neoplásicas da carcinogênese, ou seja, na fase de iniciação ou promoção, e antes do estabelecimento da etapa de progressão (SPORN et al., 1976).

Diversos CBAs são capazes de modular distintos processos biológicos relacionados à carcinogênese e à quimioprevenção de neoplasias, como a proliferação celular, diferenciação celular e a apoptose; contudo, seus mecanismos de ação são pouco compreendidos (MO; ELSON, 2004; AGGARWALL; SHISHODIA, 2006). Nesse contexto, a investigação desses mecanismos contribui não somente 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; DE FLORA et al., 2001).

Dentre os inibidores da carcinogênese identificados até o momento, pode-se citar alguns derivados do metabolismo do mevalonato em plantas, denominados isoprenóides, em função de sua promissora ação relatada na quimioprevenção do câncer (MORENO et al., 1995; CROWELL, 1999; ELSON et al., 1999; MO; ELSON, 2004; ESPINDOLA et al., 2005; ONG et al., 2006; CARDOZO et al., 2011).

Os isoprenóides, largamente distribuídos em frutas, hortaliças e grãos de cereais, são uma classe de substâncias com mais de 23.000 constituintes, com diferentes complexidades e funções (BACH, 1995; EDWARDS; ERICSSON, 1999; MO; ELSON, 1999). Estes podem ser denominados isoprenóides “puros”, que são constituídos exclusivamente por múltiplos de unidades isoprênicas (unidades de 5 carbonos), como monoterpenos (duas unidades), sesquiterpenos (três unidades), diterpenos (quatro unidades), triterpenos (seis unidades), tetraterpenos (oito unidades) e politerpenos (n unidades), enquanto que aqueles denominados

“mistos” apresentam apenas parte de suas moléculas derivada da via do mevalonato (BACH, 1995; SACCHETTINI; POULTER, 1997; ELSON et al., 1999).

Como demonstrado na Figura 1, através da via do mevalonato é formado um número excepcional de isoprenóides, podendo-se citar dentre eles o monoterpeno *d*-limoneno, presente em óleos essenciais da laranja e outras frutas cítricas; álcool perilílico presente na cereja e hortelã e a β-ionona (BI) presente em uvas e aromatizantes de vinhos (STERMER; BIANCHINI; KORTH, 1994).

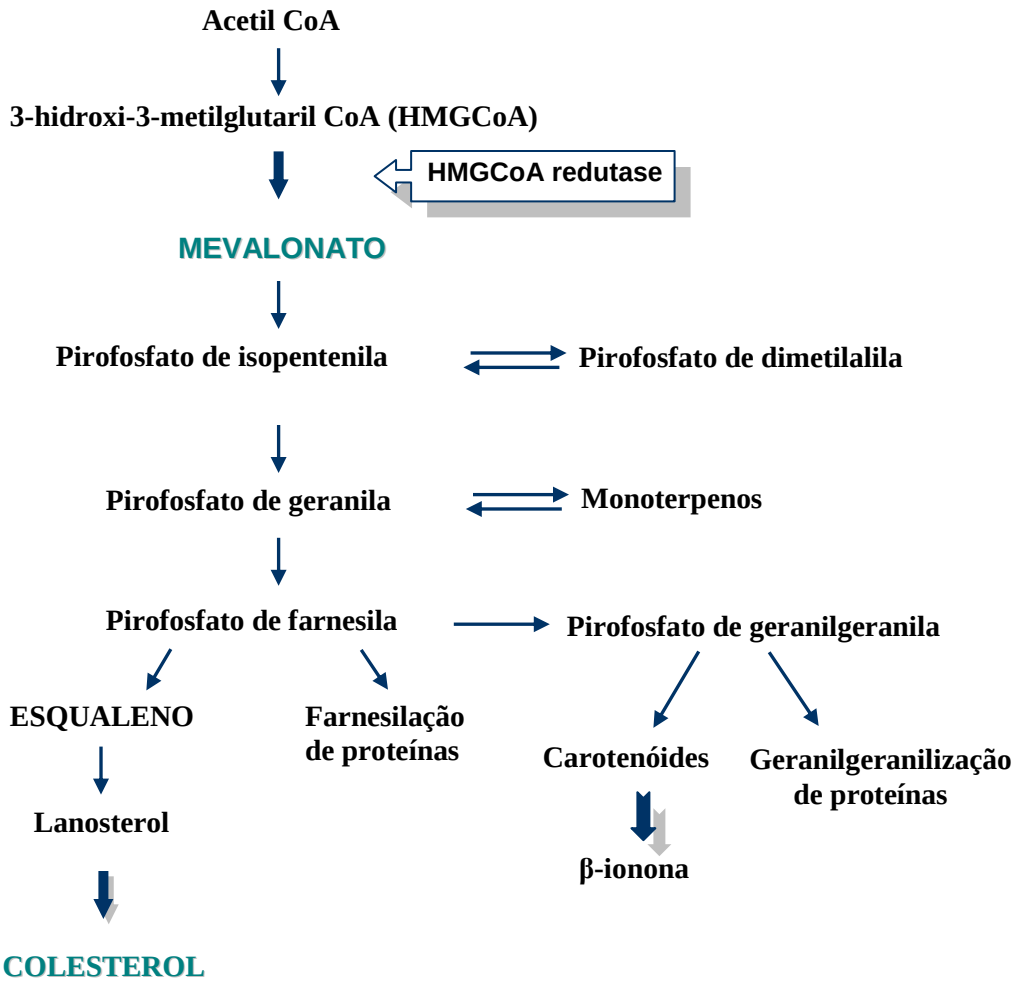
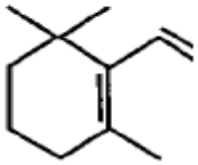


Figura 1. Via resumida do mevalonato. **Fonte:** Adaptada de CROWELL et al., 1991; BACH, 1995; ELSON, 1995.

Em diversos trabalhos foi observado que os isoprenóides podem modular o processo da hepatocarcinogênese. Dentre eles constatou-se efeito mais pronunciado da β-ionona, um sesquiterpeno presente na estrutura molecular do retinol, β-caroteno e ácido retinóico (Figura 2). Este composto representa uma subclasse dos isoprenóides cíclicos (MO; ELSON, 1999; MO; ELSON, 2004).



Fonte: TATMAM, MO, 2002

Figura 2. Estrutura química do isoprenóide cíclico β-ionona.

A β-ionona tem sido descrita também como um agente quimiopreventivo em estudos experimentais, *in vivo e in vitro* (MO; ELSON, 2004). O tratamento com este composto suprimiu a proliferação de células B16 de melanoma e células MCF-7 e MDA-MB-231 mamárias (ELSON, 1995; HE et al., 1997; MO; ELSON et al., 1999). Além disso, Liu e colaboradores (2004) observaram inibição do crescimento de células SGC-7901 de adenocarcinoma gástrico humano, bem como indução da apoptose após tratamento com BI. No entanto, os mecanismos pelos quais este isoprenóide exerce suas atividades ainda requerem mais investigações.

Em trabalhos prévios, observou-se atividade quimiopreventiva da BI quando administrada durante a fase de iniciação e promoção inicial da hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH. A atividade quimiopreventiva da BI foi atribuída à inibição da proliferação celular nas LPN e nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN (ESPÍNDOLA et al., 2005). De forma semelhante, atividade quimiopreventiva da BI foi

observada também quando administrada somente durante a etapa de promoção da hepatocarcinogêse em ratos Wistar, devido à inibição da proliferação celular de LPN e à indução da remodelação de LPN (CARDOZO et al., 2011). Com esta propriedade da BI de induzir a remodelação das LPN, pode-se esperar que este composto venha a atuar na rediferenciação dos hepatócitos para um fenótipo semelhante ao do tecido normal.

Inibição da proliferação celular em LPN foi observada também após administração de β-caroteno em ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. Este composto teve efeito inibitório em pLPN e atividade estimuladora notável em rLPN γ-GT positivas (RIZZI et al., 1997). Em outro estudo observou-se ação tanto do β-caroteno, como da vitamina A, na modulação da proliferação das células ovais, o que sugere sua participação no processo de diferenciação celular *in vivo*. Nesse estudo, a eutanásia foi realizada em dias que acompanham a cinética das células ovais, sendo que a maior taxa de proliferação destas, encontrada no 9º dia após a hepatectomia parcial, ocorreu no grupo tratado somente com óleo de milho (controle) (NAVES et al., 2001).

Baseando-se no fato da BI apresentar em sua estrutura o mesmo anel cíclico encontrado no β-caroteno, ventou-se a hipótese neste trabalho que a BI reduz o número de células ovais hepáticas, regulando proteínas que possam estar relacionadas ao papel destas células na hepatocarcinogênese.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a cinética das células ovais hepáticas na atividade quimiopreventiva da BI quando administrada a ratos Wistar durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

2.2 Específicos

- Avaliar se o tratamento com BI reduz a expressão das proteínas (CK19, β-catenina e ALDH1A1) que possam influenciar a presença de células ovais;
- Verificar se há diferenças na expressão das proteínas CK19, β-catenina e ALDH1A1 em LPN persistentes e LPN em remodelação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Inicialmente, foram obtidos 90 ratos machos, albinos, da linhagem Wistar, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais de Experimentação em reunião de 07 de fevereiro de 2011, segundo o Protocolo CEUA/FCF/294.

Em decorrência de problemas na linhagem utilizada, que gerou alta taxa de mortalidade de animais logo no início do experimento, foram utilizadas amostras de fígado provenientes do projeto de Pós-Doutorado "Efeito da β-ionona na cinética de lesões pré-neoplásicas persistentes e em remodelação no fígado de ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do Hepatócito Resistente (RH)", da Pós-doutora Clarissa Scolastici, do Laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FBA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais de Experimentação (Protocolo número 225).

No referido trabalho, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (no máximo 4 ratos/gaiola) com tampas de aço inoxidável e contendo maravalha previamente esterilizada, trocada rotineiramente em dias alternados. Estes receberam "*ad libitum*", durante todo o experimento, água destilada e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Campinas, Brasil), sendo ainda controlados o consumo de ração e seus pesos diariamente.

O ensaio biológico foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP em ambiente apropriado para condução de estudos de carcinogênese, com temperatura (22ºC ± 2ºC), luz (ciclo de iluminação claro-escuro de 12 h) e umidade ambiental controladas.

3.2 Modelo de Hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"

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

A iniciação dos animais ocorreu pela administração intraperitoneal de dose única 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 duas semanas os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses consecutivas, via intragástrica, 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 anestesiados com éter etílico (Merck, Brasil). Finalmente, 48 horas após a hepatectomia parcial os animais receberam, por via intragástrica, uma dose de 2-AAF (0,75mg/100g p.c.) também dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho.

3.3 Protocolo experimental

Após um período de aclimatação de 07 dias, 48 animais foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH e distribuídos aleatoriamente em 2 diferentes grupos experimentais (Figura 3). Em adição, 6 animais constituíram um grupo de ratos não tratados (grupo NT), 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.

Os grupos experimentais foram compostos por 18 animais cada, sendo estes distribuídos em 3 pontos de eutanásia para avaliação da cinética das células ovais hepáticas. Seis dos animais que foram submetidos ao modelo do RH não receberam tratamento, pois estes foram eutanasiados no dia do início do mesmo (P0).

→ **Grupo Óleo de Milho (OM) – Grupo Controle:** composto por 18 animais submetidos ao modelo do RH e tratados via intragástrica, com OM (Mazola®; 0,25mL/100g p.c.), diariamente, a partir do 7º dia após a HP, durante 4 semanas consecutivas, até a eutanásia;

→ **Grupo β-ionona (BI):** composto por 18 animais submetidos ao modelo do RH e tratados via intragástrica com BI (95%; Sigma, EUA; 16mg/100g p.c.) dissolvido em óleo de milho (Mazola®; 0,25 mL/100 g p.c.), diariamente, a partir do 7º dia após a HP, durante 4 semanas consecutivas, até a eutanásia.

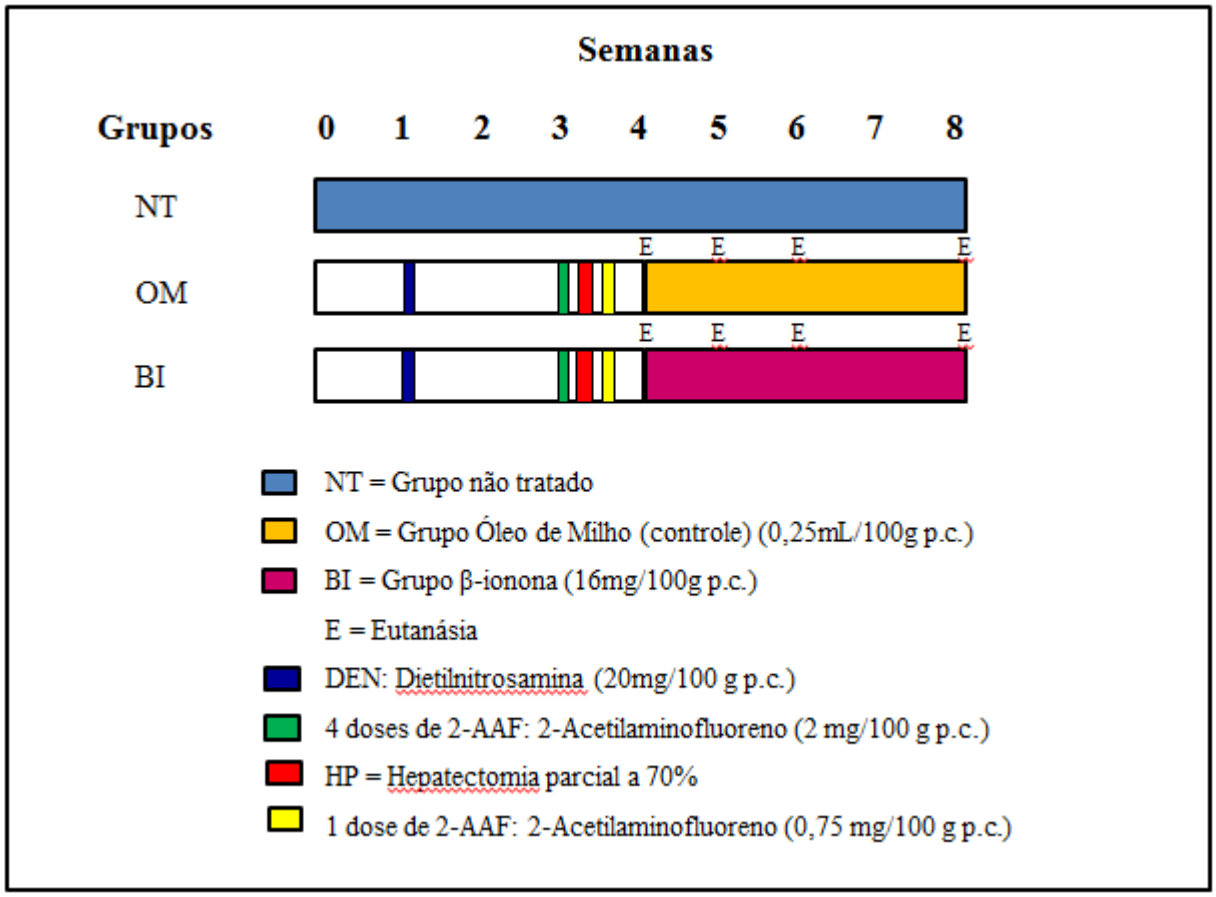


Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental.

3.4 Eutanásia dos Animais

Foram realizados 4 pontos de eutanásia: 1º ponto (P0): 7 dias após a HP (sem tratamento) e 2º ponto (P1): 14 dias após a HP (7º dia de tratamento), sendo observado, no intervalo entre estes dois dias, o pico das células ovais (NAGY; BISGGARD; THORGEIRSSON, 1994; ZHANG; THORGEIRSSON, 1994; NAVES et al., 2001; DARWICHE et al., 2011); 3º ponto (P2): 21 dias após a HP (2ª semana de tratamento), momento em que pode ocorrer a diferenciação das células ovais em hepatócitos ou colangiócitos (DARWICHE et al., 2011) e 4º ponto (P3): 35 dias após a HP (4ª semana de tratamento), sendo o final do tratamento.

Os animais foram anestesiados com éter, procedendo-se, a seguir, à laparotomia para coleta se sangue (2 a 3 mL por animal) por punção da aorta abdominal. A eutanásia se deu pela secção da aorta abdominal e consequente choque hipovolêmico.

Amostras de tecido hepáticos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C.

3.5 Marcação Imunoistoquímica para GST-P, CK19, β-catenina e ALDH1A1

O método utilizado para a realização da marcação imunoistoquímica para GST-P, CK19, β-catenina e ALDH1A1 foi o da avidina-biotina (HSU; RAINE; FANGER, 1981), empregando-se anticorpos primários específicos (Tabela 1).

Os cortes histológicos dos materiais incluídos em parafina foram desparafinizados em xilol e na seqüência xilol/álcool (1:1), em seguida hidratados pela sequência de etanol absoluto, 95% e 70% e, finalmente, água destilada. Todos os cortes foram pré-tratados com ácido cítrico e citrato de sódio.

A peroxidase endógena foi bloqueada mergulhando-se as lâminas por 30 minutos em peróxido de hidrogênio a 3% (Merck, Brasil). O bloqueio das proteínas foi realizado mergulhando-se as lâminas em solução de leite em pó molico a 3% em PBS durante 1h. Os cortes serão foram incubados com os anticorpos primários específicos durante 16h a 4°C em câmara úmida. Para diluição do anticorpo primário, foi utilizada solução contendo soro-albumina a 1% (albumina bovina fração V; Sigma, EUA) em PBS.

Em seguida, os cortes foram incubados por 30 minutos com anticorpo secundário biotinilado universal e, posteriormente, com complexo de streptavidina ligado a peroxidase

(Dako, Dinamarca) por 30 minutos. Finalmente, foi aplicada nos cortes uma solução preparada com diaminobenzidina (DAB; Dako, Dinamarca). Os cortes foram contracorados pela hematoxilina de Harris e montados com meio aquoso (DAKO, Dinamarca).

Cada procedimento foi intercalado por lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fosfato [PBS (NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 10 mM; KCl 2,68 mM; KH_2PO_4 1,76 mM e água ultra-pura, pH 7,4)].

Os resultados da imunoistoquímica foram expressos quanto a frequência dos marcadores CK19, β-catenina e ALDH1A1 em pLPN e rLPN GST-P positivas.

Tabela 1. Anticorpos primários utilizados na reação de imunoistoquímica para GST-P, CK19, β-catenina e ALDH1A1.

Anticorpo	Diluição	Marca
ALDH1A1	1:200	Sigma
β-catenina	1:500	Sigma
CK19	1:50	Sigma
GST-P	1:1000	MBL

3.6 Quantificação de LPN GST-P positivas

Para se quantificar o número das LPN GST-P positivas foi utilizado o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha). As LPN GST-P positivas foram classificadas como sendo persistentes (marcação imunoistoquímica uniforme e bordas regulares) ou em

remodelação (perda da uniformidade de marcação imunoistoquímica e bordas irregulares) (RIZZI et al., 1997; WOOD et al., 1999; SILVEIRA et al., 2001).

3.7 Frequência dos marcadores CK19, β-catenina e ALDH1A1 em LPN positivas para GST-P

A avaliação da frequência da expressão de CK19, β-catenina e ALDH1A1 foi realizada pela quantificação da presença de cada um desses marcadores em LPN GST-P positivas (persistentes ou em remodelação). Os valores foram expressos em % pLPNs ou rLPNs positivas para ALDH1A1, β-catenina e CK19. Para esta avaliação foi utilizado o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

3.8 Quantificação das células ovais

As células ovais foram quantificadas pela técnica de avaliação da fração volumétrica estimada, através de pontos de interseção (WEIBEL, 1963). Foram analisadas zonas periportais encontradas em cortes histológicos de fígado corados para GST-P. Pelo menos 15 zonas periportais, consideradas áreas de proliferação de células ovais, foram avaliadas por corte. Uma grade com 88 pontos foi posicionada sobre os espaços porta e o número de pontos de intersecção incidentes sobre células ovais GST-P positivas foi registrado. Esta percentagem foi considerada a fração volumétrica destas células presentes no fígado (AHERNE; DUNNIL, 1982; DAGLI et al., 1998). Para tanto, foi utilizado o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

3.9 Análise Estatística

Os dados relativos ao número, tamanho médio e porcentagem de área ocupada por pLPN e rLPN GST-P positivas foram analisados pelo teste ANOVA seguido de Tukey. A fração volumétrica de células ovais bem como a incidência de pLPN e rLPN que expressaram as proteínas CK-19, β-catenina e ALDH1A1 foi avaliada pelo teste exato de Fischer. Para tanto foi utilizado o software GraphPad InStat3 e a diferença estatística entre os parâmetros foi considerada para valores de $p<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Análise de LPN GST-P positivas

Na tabela 2 estão apresentados os resultados referentes à análise de pLNP e rLPN hepáticas GST-P positivas (Figura 4a e 4b, respectivamente) dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com BI ou OM na etapa de promoção da hepatocarcinogênese e eutanasiados em diferentes momentos do estudo.

Foi observado que o tratamento com BI reduziu o número de rLPN ($p<0,05$) e apresentou maior ($p<0,05$) % de remodelação quando comparado ao grupo OM após as 4 semanas de tratamento.

Nos animais tratados com OM, pode-se observar no último ponto redução ($p<0,05$) do número de rLPN em relação ao P1, bem como aumento ($p<0,05$) da área de pLPN e rLPN. Já no grupo BI, verificou-se no final do tratamento diminuição ($p<0,05$) do número e na % de área de pLPN em relação ao P1 e aumento ($p<0,05$) do número de rLPN em relação ao P2.

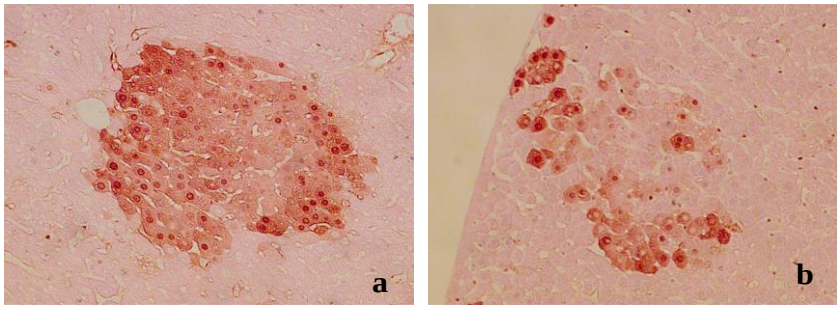


Figura 4. Corte histológico de lesões pré-neoplásicas GST-P positivas em fígado de rato Wistar submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. **(a)** Lesão pré-neoplásica persistente (20x); **(b)** Lesão pré-neoplásica em remodelação (20x). **Fonte:** Clarissa Scolastici.

Tabela 2. Lesões GST-P positivas de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona e óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

Grupos	Nº de animais	pLPN (n/cm^2)	rLPN (n/cm^2)	LPN totais (n/cm^2)	% Remodelação	pLPN (Área/cm^2)	rLPN (Área/cm^2)	pLPN (% Área)	rLPN (% Área)
PO	9	78,52±27,76	59,55±21,05	138,07±24,39	41,30±14,6	0,12±0,04	0,17±0,06	10,63±3,76	7,94±2,80
OM P1	9	72,83±24,28	68,60±22,87	141,42±71,74	45,64±15,21	0,13±0,04	0,05±0,02	8,59±2,87	2,53±0,84
OM P2	9	69,17±23,06	42,94±14,31	112,12±50,66	44,09±14,7	0,18±0,06	0,07±0,02	17,84±5,95	2,77±0,92
OM P3	9	49,97±15,98	28,10±9,37ª	78,07±17,07	36,99±12,33	0,33±0,011a	0,13±0,04a	14,33±4,78	3,11±1,04
BI P1	9	86,63±28,88	60,00±20,0	146,63±61,08	43,62±14,54	0,16±0,05	0,04±0,01	17,91±5,97	2,64±0,88
BI P2	8	66,76±30,21	45,18±15,97	111,94±26,82	42,30±14,96	0,18±0,06	0,06±0,03	17,47±6,17	3,93±1,39
BI P3	9	54,05±18,01ª	62,50±20,83b	116,55±31,61b	54,55±18,18b	0,16±0,05	0,06±0,02b	8,51±2,84	3,76±1,25

* Média ± Desvio Padrão; OM = (0,25 mL; 100g p.c.); BI = β-ionona (16 mg / kg p.c.);
pLNP = Lesões pré-neoplásicas persistentes; rPLN = Lesões pré-neoplásicas em remodelação;
P0, P1, P2, P3 e P4 (eutanásia após 7, 14, 21, 28, e 35 dias da HP);
a: diferença estatística em relação ao respectivo ponto 1 ($p<0,05$);
b: diferença estatística em relação ao grupo OM ($p<0,05$).
Anova seguido de Tukey. **Fonte:** Clarissa Scolastici.

4.2 Quantificação das células ovais

Células ovais foram identificadas em cortes histológicos de fígados marcados para GST-P (Figura 10A). Maior expressão das mesmas foi encontrada em regiões periportais (espaço-porta). Pode-se observar que o tratamento com BI reduziu ($p<0,05$) o percentual da fração volumétrica de células ovais GST-P positivas nas zonas periportais no P2 e P3 em relação ao grupo controle OM. Na 1ª semana de tratamento, observou-se diminuição deste percentual pela BI, no entanto sem significância estatística. Foi identificada também redução ($p<0,05$) do percentual entre os pontos P1 e P2 e P2 e P3 nos animais tratados com BI (Figura 5).

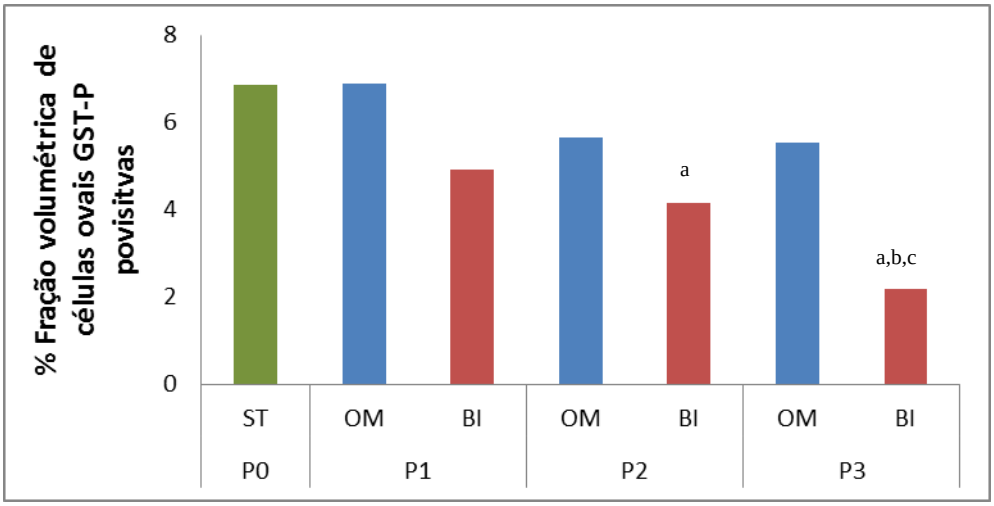


Figura 5. Fração volumétrica (%) de células ovais GST-P positivas em zonas periportais de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

ST = sem tratamento; OM = óleo de milho (controle); BI = β-ionona; LNP = Lesões pré-neoplásicas; P0, P1, P2 e P3 (eutanásia pós 7, 14, 21e 35 dias da HP; 0, 7, 14, 28 dias de tratamento).

[a] diferença estatística em relação ao grupo OM (controle) ($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

[b] diferença estatística em relação ao respectivo P1($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

[c] diferença estatística em relação ao respectivo P2($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

4.3 Percentual de LPN positivas para CK19

Foi observada marcação de CK19 no citoplasma dos hepatócitos das LPN (Figura 10B). O tratamento com BI reduziu ($p<0,05$) o percentual de pLPN e rLPN positivas para CK19 na última semana de tratamento (P3) em relação ao respectivo controle OM. Nos primeiros pontos (P1 e P2) o tratamento com BI também reduziu este percentual, embora sem significância estatística. Além disso, pode-se verificar diminuição ($p<0,05$) deste percentual entre os pontos P1 e P3 e P2 e P3 no grupo tratado com BI (Tabela 3). Não foi observada expressão significativa deste marcador no tecido ao redor das LPN (*surrounding).*

Tabela 3. Percentual de LPN positivas para CK19 no citoplasma de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

Grupos	LPN persistentes	LPN em remodelação
P0	69,43	56,66
P1 OM	67,01	58,06
P1 BI	63,71	53,06
P2 OM	65,05	54,54
P2 BI	59,62	49,49
P3 OM	58,11	48,28
P3 BI	39,25[a,b,c]	21,74[a,b,c]

OM = óleo de milho (controle); BI = β-ionona; LNP = Lesões pré-neoplásicas; P0, P1, P2 e P3 (eutanásia após 7, 14, 21e 35 dias da HP; 0, 7, 14, 28 dias de tratamento).

[a] diferença estatística em relação ao grupo OM (controle) ($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

[b] diferença estatística em relação ao respectivo P1($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

[c] diferença estatística em relação ao respectivo P2($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

4.4 Percentual de LPN positivas para β-catenina

Nas figuras 6, 7, 8 e 9 podem-se observar os resultados referentes ao percentual de LPN positivas para β-catenina no núcleo ou na membrana dos hepatócitos (Figura 10C)

No grupo de animais que não recebeu tratamento (P0), foi observada maior ($p<0,05$) marcação de β-catenina no núcleo (9,33%) e na membrana (60,10%) dos hepatócitos nas pLPN em relação às rLPN (núcleo - 1,67%; membrana - 48,33%). Pode-se observar também que a marcação nuclear não foi tão evidente quanto à marcação na membrana (Figura 6).

Na 1ª semana de tratamento (P1) não houve diferença estatística significativa entre o grupo tratado com BI e o grupo controle OM. No entanto, foi encontrado maior ($p<0,05$) número de pLPN marcadas para β-catenina em relação às rLPN, no núcleo e membrana dos hepatócitos dos animais do grupo OM e no núcleo dos hepatócitos do grupo BI (Figura 7).

Já na 2ª semana de tratamento (P2), pode-se observar redução ($p<0,05$) significativa do número de pLPN com marcação na membrana dos hepatócitos dos animais tratados com BI (40,38%) quando comparados aos animais do grupo controle OM (73,12%). Em ambos os grupos a incidência de pLPN com marcação nuclear e na membrana foi maior ($p<0,05$) em relação às rLPN (Figura 8).

Na última semana de tratamento ocorreu redução ($p<0,05$) do percentual de lesões positivas para β-catenina na membrana dos hepatócitos dos animais que receberam BI quando comparados aos animais do grupo controle OM, tanto nas pLPN (BI - 42,05%; OM - 77,03%) como nas rLPN (BI - 18,48%; OM - 55,17%). Em ambos os grupos a incidência de pLPN marcadas para β-catenina na membrana foi maior ($p<0,05$) em relação às rLPN. Não foi observada significância estatística em relação à marcação nuclear (Figura 9).

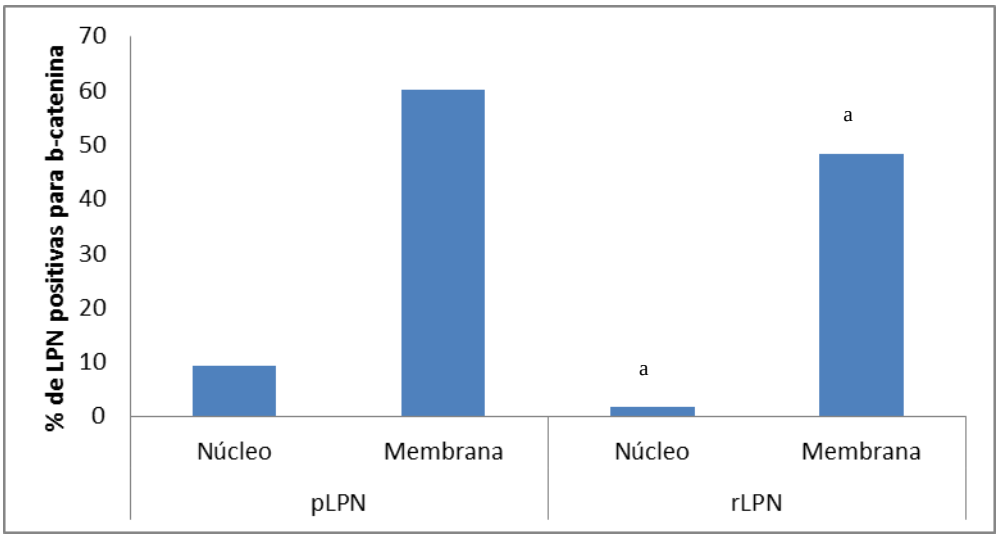


Figura 6. Percentual de LPN positivas de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese para β-catenina no Ponto 0 (P0 = 7 dias após a HP; sem tratamento).

LPN = Lesões pré-neoplásicas; pLPN = Lesões pré-neoplásicas persistentes; rLPN = Lesões pré-neoplásicas em remodelação.

[a] diferença estatística em relação a pLPN ($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

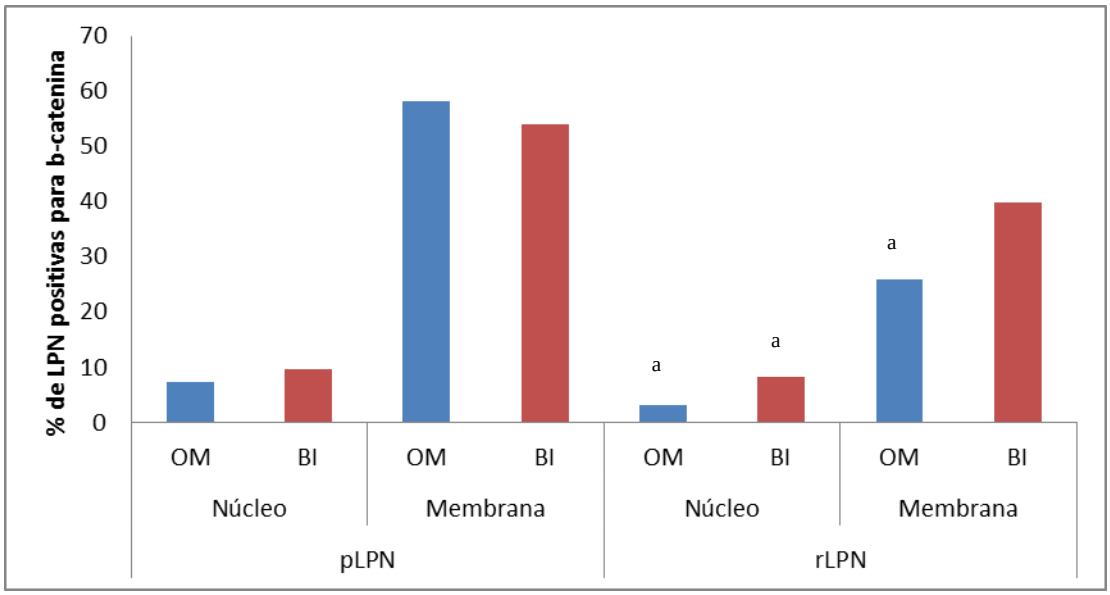


Figura 7. Percentual de LPN positivas de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese para β-catenina no Ponto 1 (P1 = 14 dias após a HP; 1 semana de tratamento).

OM = óleo de milho (controle); BI = β-ionona; LPN = Lesões pré-neoplásicas; pLPN = Lesões pré-neoplásicas persistentes; rLPN = Lesões pré-neoplásicas em remodelação.

[a] diferença estatística em relação a pLPN ($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

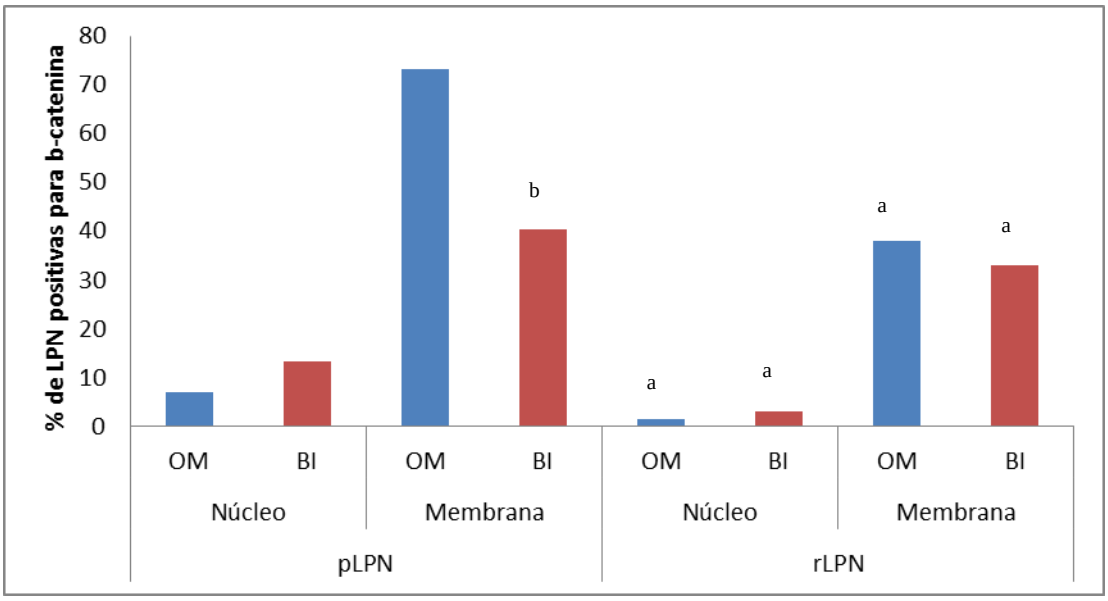


Figura 8. Percentual de LPN positivas de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese para β-catenina no Ponto 2 (P2 = 21 dias após a HP; 2 semanas de tratamento).

OM = óleo de milho (controle); BI = β-ionona; LPN = Lesões pré-neoplásicas; pLPN = Lesões pré-neoplásicas persistentes; rLPN = Lesões pré-neoplásicas em remodelação.

[a] diferença estatística em relação a pLPN ($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

[b] diferença estatística em relação ao grupo OM (controle) ($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

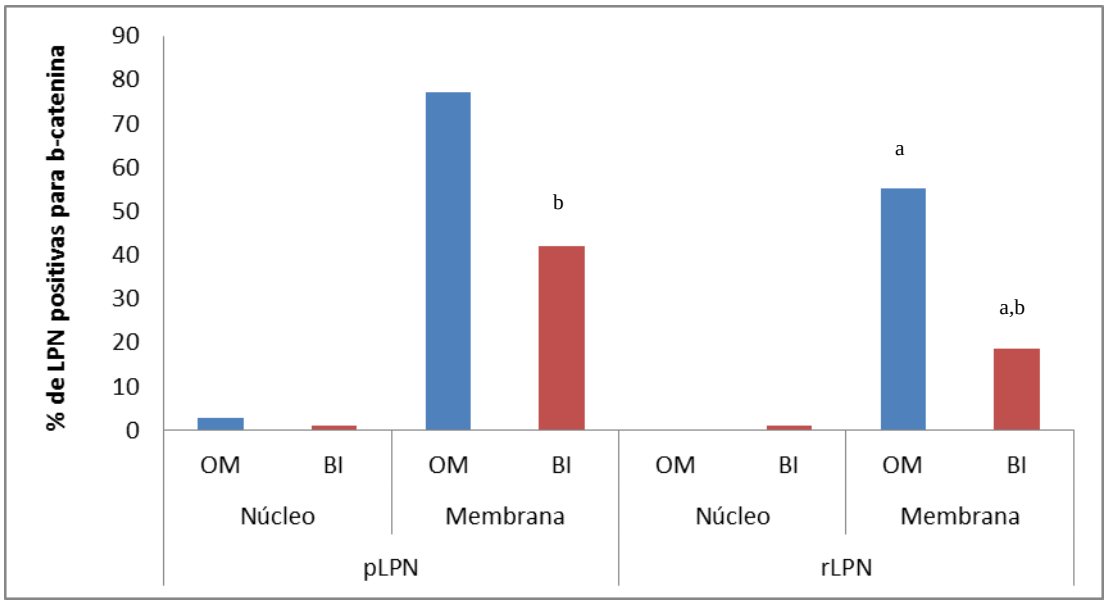


Figura 9. Percentual de LPN positivas de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese para β-catenina no Ponto 3 (P3 = 35 dias após a HP; 4 semanas de tratamento).

OM = óleo de milho (controle); BI = β-ionona; LPN = Lesões pré-neoplásicas; pLPN = Lesões pré-neoplásicas persistentes; rLPN = Lesões pré-neoplásicas em remodelação.

[a] diferença estatística em relação a pLPN ($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

[b] diferença estatística em relação ao grupo OM (controle) ($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

4.5 Percentual de LPN positivas para ALDH1A1

A enzima ALDH1A1 foi identificada no citoplasma dos hepatócitos das LPN (Figura 10D). Os animais tratados com BI apresentaram menor ($p<0,05$) o percentual de rLPN positivas para esta enzima comparados aos animais que receberam OM (controle), tanto na 2ª semana (P2) quanto na última semana de tratamento (P3). Nas pLPN, o tratamento com BI reduziu ($p<0,05$) a

expressão de ALDH1A1 somente na última semana de tratamento. Na 1ª semana de tratamento (P1) a BI também reduziu o percentual de pLPN e rLPN marcadas para esta enzima, embora sem significância estatística (Tabela 4). Não foi observada expressão significativa desta proteína no *surrounding*.

Tabela 4. Percentual de LPN positivas para ALDH1A1 no citoplasma de fígado de ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com β-ionona ou óleo de milho na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

Grupos	LPN persistentes	LPN em remodelação
P0	59,76	50,00
P1 OM	67,39	50,00
P1 BI	45,65	37,50
P2 OM	58,97	48,00
P2 BI	40,00	23,53[a]
P3 OM	72,22	62,85
P3 BI	32,65[a]	19,15[a]

OM = óleo de milho (controle); BI = β-ionona; LNP = Lesões pré-neoplásicas; P0, P1, P2 e P3 (eutanásia após 7, 14, 21e 35 dias da HP; 0, 7, 14, 28 dias de tratamento).

[a] diferença estatística em relação ao grupo OM (controle) ($p<0,05$), segundo o Teste Exato de Fisher.

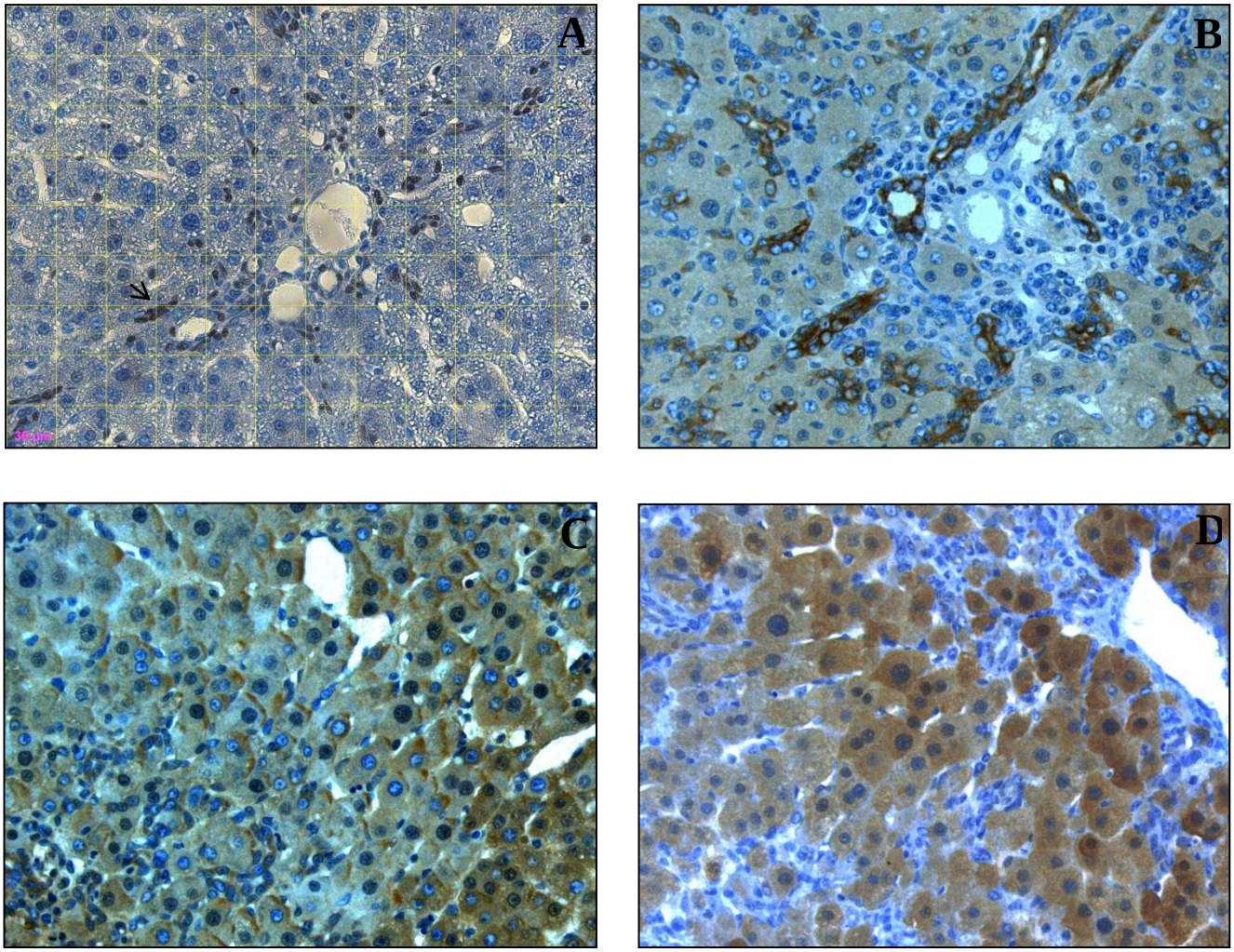


Figura 10. Imagens representativas de: A) Pontos de intersecção de região periportal apresentando células ovais GST-P positivas (seta); B, C e D) Marcação imunoistoquímica para CK19, β-catenina e ALDH1A1, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

O HCC apresenta evolução desfavorável visto que esta neoplasia possui mau prognóstico e alto índice de mortalidade, sendo, portanto, necessárias medidas de prevenção. Nesse sentido, a BI, isoprenóide cíclico, demonstrou atividade quimiopreventiva quando administrada diariamente por 7 semanas consecutivas, na dose de 16 mg/ 100 g de p.c, durante as fases de iniciação e seleção/promoção da hepatocarcinogênese, a ratos submetidos ao modelo do RH, aumentando o número de rLPN bem como diminuindo o número de pLPN quando comparada ao grupo controle óleo de milho (ESPÍNDOLA et al., 2005). Além disso, Cardozo e colaboradores (2011) demonstraram atividade quimiopreventiva da BI (16 mg/ 100 g de p.c.) por diminuição da proliferação celular e indução da remodelação, em relação ao grupo controle óleo de milho, quando administrada 8 dias após a HP durante 5 semanas na etapa de promoção da hepatocarcinogênese (CARDOZO et al, 2011).

Em estudo prévio do grupo (dados não publicados), observou-se resultados semelhantes aos anteriormente citados em relação à atividade quimiopreventiva da BI na indução de rLPN. Devido a isso, foram realizadas análises referentes a mecanismos envolvidos na cinética das rLPN e das pLPN, como a presença das células ovais em ambos tipos de lesões e proteínas. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o composto quimiopreventivo BI, quando administrado a ratos Wistar durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente", poderia reduzir o número de células ovais hepáticas e alterar a expressão de proteínas que poderiam influenciar a presença destas células.

Evidências demonstram que em condições de lesão tecidual hepática o fígado utiliza uma nova fonte de células para auxiliar na sua auto-renovação devido ao atraso na proliferação de hepatócitos. Essas células são chamadas de "células ovais" (progenitoras), devido ao formato de

seu núcleo, e se encontram em pequena quantidade no tecido hepático normal (DARWICHE et al., 2011; XU et al., 2011). A ativação de uma população de células progenitoras pode ser induzida experimentalmente em modelos de lesão hepática em roedores. Um modelo bastante pertinente que demonstra a proliferação de células ovais, na região periportal, podendo ser precursora do HCC, é o modelo do RH desenvolvido por Solt e Farber (1976) (EVARTS et al., 1987; APTE et al., 2008; BOWEN; MONGA, 2011).

Quando a ativação das células ovais ocorre, estas se tornam potenciais alvos no desenvolvimento da hepatocarcinogênese (ANDERSEN et al., 2010). A descoberta de CBAs que possam agir na diferenciação destas células em hepatócitos é importante para a quimioprevenção da hepatocarcinogênese. Assim, pode-se observar que o tratamento com BI reduziu a fração volumétrica de células ovais GST-P positivas nas regiões periportais. Portanto, sugere-se que tenha ocorrido uma parada da proliferação das células ovais nos animais tratados com BI. Esta observação é consistente com resultados de trabalhos realizados também em ratos submetidos ao modelo do RH, em que o β-caroteno mostrou efeito inibitório sobre LPNs e reduziu o número de células ovais no final do período experimental (DAGLI et al., 1998).

Naves e colaboradores (2001), em estudo realizado com ratos Wistar submetidos ao modelo de diferenciação de células ovais (AAF e HP), observaram ação tanto do β-caroteno como da vitamina A na modulação da proliferação destas células, o que sugere sua participação no processo de diferenciação celular *in vivo*. Nesse estudo, a eutanásia foi realizada em dias que acompanham a cinética das células ovais, sendo que a maior taxa de proliferação destas, encontrada no 9º dia após a HP, ocorreu no grupo tratado somente com óleo de milho (controle).

A presença de CK19 no HCC é considerada um marcador de mau prognóstico da doença, e sua expressão anormal no parênquima hepático tem sido atribuída à proliferação das células progenitoras hepáticas (ANDERSEN et al., 2010). No presente estudo, o tratamento com BI reduziu o percentual de pLPN e rLPN positivas para CK19 no final do experimento, podendo então contribuir para minimizar as chances do desenvolvimento de HCC ou na melhora de seu prognóstico. Estudo realizado com ratos F344 submetidos ao modelo do RH demonstrou que aproximadamente 50% das LPN GST-P positivas expressaram CK19 no citoplasma do hepatócito, não foi observada marcação no *surrounding* e todos os HCC foram uniformemente CK19 positivos. Foi verificado então, que a CK19 é um marcador de prognóstico de pLPN no fígado (ANDERSEN et al., 2010).

A marcação de CK19 foi encontrada no citoplasma dos hepatócitos e em células que aparentavam estar se desdiferenciando em células ductulares. Esta observação também foi verificada em estudos realizados em humanos com diagnóstico de HCC, no qual 28% das pessoas que apresentavam a doença expressavam CK19. Além disso, a presença de células que expressam CK19 no HCC pode ser o resultado de desdiferenciação de hepatócitos maduros para um fenótipo de célula progenitora/ductular (DURNEZ et al., 2006).

Assim como a CK19, a proteína β-catenina também é encontrada altamente expressa em HCC. Inagawa e colaboradores (2002) verificaram que 60,7% dos HCC apresentavam a marcação desta proteína, inferindo que sua presença indique mau prognóstico da doença.

A via de sinalização Wnt/β-catenina desempenha papel proeminente na modulação da auto renovação, proliferação e diferenciação em vários nichos de células-tronco adultas (FODDE; BRABLETZ, 2007; YANG et al., 2008; BOWEN; MONGA, 2011). ITOH e colaboradores (2009) demonstraram que a ativação de β-catenina *in vitro* foi suficiente para induzir a proliferação de células hepáticas progenitoras. Além disso, TENG e colaboradores (2010)

relataram que a inibição *in vitro* desta proteína acarretou diminuição da proliferação de células-tronco e da resistência à fármacos em neoplasia pulmonar.

Diversos estudos em roedores elucidaram o papel da β-catenina na indução da proliferação das células ovais. Observou-se a ativação desta proteína em modelo de proliferação de células ovais em ratos, 5 e 10 dias após modelo de diferenciação destas células (2-AAF + HP), evidenciada por aumento significativo dos níveis da mesma nos núcleos de células ovais. Análises revelaram que a expressão deste marcador aumentou e permaneceu elevada até 5-7 dias pós-HP em paralelo com a indução de células ovais. Sugeriu-se, portanto, que esta expressão estaria relacionada com a expansão das células ovais (APTE et al., 2008; YANG et al., 2008; BOWEN; MONGA, 2011).

Estudos recentes verificaram marcação de β-catenina no citoplasma e núcleo de células ovais de ratos e camundongos, enquanto que em hepatócitos, a expressão deste marcador foi observada na membrana dos mesmos (YANG et al., 2008; BOWEN; MONGA, 2011). Corroborando com estes resultados, no presente estudo foi observada marcação predominante na membrana dos hepatócitos e, em menor escala, nos núcleos dos mesmos. Além disso, foi verificada maior incidência de pLPN que expressaram β-catenina em comparação com as rLPN. No decorrer do tratamento com BI, ocorreu redução da expressão deste marcador em ambas LPN. Estes resultados demonstram novamente a eficácia do tratamento com BI em relação à expressão de proteínas que conferem ao HCC mau prognóstico e maior agressividade e, também, que possam influenciar na presença das células ovais.

Em conjunto, estes estudos demonstram que β-catenina desempenha um papel crítico na cinética das células ovais. A modulação desta proteína mostra associação frequente com o prognóstico de neoplasias hepáticas (DUNCAN; DORREL; GROMPE, 2009; MARQUARDT; FACTOR; THORGEIRSSOM, 2010).

Outra proteína identificada recentemente em neoplasias hepáticas e que durante muitos anos tem sido utilizada para isolar as CSC é a enzima ALDH (KASTAN et al.,1990; MOREB, 2008; LINGALA et al., 2010). Hepatócitos ALDH positivos, assim como as células ovais, também expressam a proteína CK19 (DOLLE et al., 2011)

Aventa-se que as enzimas da família ALDH estejam envolvidas na resistência a fármacos e geração de ácido retinóico, que é crucial para a proteção das células-tronco contra aldeídos tóxicos endógenos e exógenos. O papel funcional desta enzima foi recentemente mostrado, em que dimetilaminobenzaldeído, um inibidor específico da ALDH, desregula a propriedade de auto renovação de células tronco hematopoiéticas humanas, interferindo com a biossíntese de ácido retinóico endógeno. Estes dados sugerem que ALDH pode regular a função deste tipo celular, sendo um potencial alvo terapêutico (MOREB, 2008; LI et al., 2010).

Ginestier e colaboradores (2007) mostraram que ALDH1A1 é um marcador de células-tronco mamárias normais e malignas em humanos e um preditor de mau prognóstico em pacientes portadores de neoplasias mamárias. Em estudo mais recente, *in vitro* e *in vivo*, foi verificado que células tronco ALDH1A1 positivas possuem potencial de proliferação extensiva e auto renovação, sendo capazes de se transformar em neoplásicas. Portanto, estas células podem apresentar propriedades de CSCs (LI et al., 2011).

No presente estudo, os animais tratados com BI reduziram a expressão da enzima ALDH1A1, sugerindo uma diminuição da capacidade de proliferação das células ovais.

Assim, a definição de eventuais biomarcadores de malignidade e de CSC pode contribuir para o diagnóstico precoce do HCC e possível melhora de seu mau prognóstico (MARQUARDT; FACTOR; THORGEIRSSOM, 2010).

Evidências crescentes indicam que muitas das vias de sinalização identificadas em neoplasia hepática também são ativas nas CSCs do fígado, apoiando a ideia de que a

heterogeneidade molecular do HCC pode ter origem no compartimento destas células. Portanto, estas vias podem servir como biomarcadores de prognóstico e representam potenciais alvos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, especificamente para diminuir a proliferação de células ovais (MISHRA et al, 2009;. MARQUARDT; FACTOR; THORGEIRSSOM, 2010).

Portanto, o tratamento com BI foi eficaz na redução do número das células ovais e de proteínas cuja ação pode influenciar na presença destas. Deste modo, destaca-se a atividade quimiopreventiva deste CBA na melhora do mau prognóstico do HCC conferido por estas proteínas e na redução das células ovais, consideradas potenciais alvos para o desenvolvimento desta neoplasia. Estudos futuros serão direcionados para melhor elucidar os mecanismos de ação do quimiopreventivo BI no processo de proliferação de células ovais.

6. CONCLUSÃO

A administração de BI durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo RH resultou em atividade quimiopreventiva considerada pronunciada. Esta atividade se deu pela redução das células ovais hepáticas, consideradas potenciais alvos para o desenvolvimento da hepatocarcinogênese e diminuição dos níveis de proteínas, como ALDH1A1, CK19 e β-catenina, relacionadas com a presença destas células e que conferem ao HCC mau prognóstico e maior agressividade.

7. REFERÊNCIAS

AGGARWALL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.1397-1421, 2006.

AHERNE, W. A.; DUNNILL, M. S. **Point counting and the estimation of volume fraction**. In: Morphometry. London: Edward Arnol, p.33-44, 1982.

AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILLETT, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sic**., v.92, n.12, p.5258-5265, 1995.

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

APTE, U., et al. Wnt/β-catenin signaling mediates oval cell response in rodents. **Hepatoloty**, v.47, n.1, p. 288-295, 2008.

ARAVALLI, R. N., et al. Stem cell origins and animal models of hepatocellular carcinoma. **Dig. Dis. Sci**., v.55, p.1241-1250, 2010.

BACH, T. J. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants – a review. **Lipids**, v.30, n.3, p.191-202, 1995.

BANNASCH, P.; HAERTEL, T.; SU, Q. S. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. **Toxicol. Pathol**., v.31, n.1, p.134-139, 2003.

BOWEN, K. N. N.; MONGA, S. P. S. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: Sorting the good from the bad. **Seminars in Cancer Biology**, v.21, p.44-58, 2011.

BOYLE, P.; LEVIN, B. **World Cancer Report**, IARC Nonserial Publication, 2008.

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

CHEN, C. J.; YU, M. W.; LIAW, Y. F. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. **J. Gastroenterol. Hepatol**., v.12, 1997.

CHIARELLO, P. G., et al. Effect of a necrogenic dose of diethylnitrosamine on vitamin E-deficient and vitamin E-supplemented rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.36, n.11, p.929-935, 1998.

CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **Journal of Nutrition**, v.129, p.775-778, 1999.

DAGLI, M. L. Z., et al. Beta-carotene reduces the ductular (oval) cell reaction in the liver of Wistar rats submitted to the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. **Pathology**, v.30, p.259-166, 1998.

DARWICHE, H., et al. Inhibition of Notch signaling affects hepatic oval cell response in rat model of 2AAF-PH. **Hepat. Med.**, v.3, p.89-98, 2011.

DE FLORA, S., et al. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. **Mutation Research**, v.480-481, p.9-22, 2001.

DE MIGLIO M. R., et al. Phenotypic reversion of rat neoplastic liver nodules is under genetic control. **Int. J. Cancer**, v.105, n.01, p.70-75, 2003.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the united states today. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.66, p.1191-1308, 1981.

DOLLÉ, L., et al. Successful isolation of liver progenitor cells by aldehyde dehydrogenase activity from naïve mice. **Hepatology**, Set. 2011.

DUNCAN, A. W.; DORRELL, C.; GROMPE, M. Stem cells and liver regeneration. **Gastroenterology**, v.137, p.466-481, 2009.

DURNEZ, A., et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. **Histopathology**, v.49, p.138-151, 2006.

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

EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L.Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v.132, n.7, p.2557-2576, 2007.

EL-SERAG, H. B. Hepatocellular Carcinoma. **N. Engl. J. Med**, v.365, p.1118–1127, 2012.

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

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

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

EVARTS, R. P., et al. A precursor-product relation-ship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. **Carcinogenesis**, v.8, p.1737-1740, 1987.

FARBER, E. Clonal adaptation during carcinogenesis. **Biochem Pharmacol**., v.39, n.12, p.1837-1846, 1990.

FARBER, E.; RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. **Cancer Research**, v.51, n.11, p.2751-2761, 1991.

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

FARBER, E., et al. The biochemical-molecular pathology of the stepwise development of liver cancer: new insights and problems. In: **Liver Cell Carcinoma**. Falk Symposium 51. P. BANNASCH, D. KEPPLER, G. WEBER, eds. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 273-291, 1988.

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

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Gobocan 2008. **Int J Cancer**, v127, n.12, p.2893-2917, 2010.

FODDE, R.; BRABLETZ, T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. **Curr Opin Cell Biol**, v.19, p.150-158, 2007.

FRAU M., et al. Prognostic markers and putative therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 179-193, 2010.

GAROFOLO, A., et al. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Rev. Nutr**., Campinas, v.17, n.4, 2004.

GINESTIER, C., et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. **Cell Stem Cell**, v.15, p.555-567, 2007.

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

HEINDRYCKX, F.; COLLE, I.; VLIERBERGHE, V. H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. **Int. J. Exp Pathol.**, v.90, n.4, p.367-386, 2009.

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

HIGGINS, G. M.; ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Arch Pathol**, v.12, p. 186-202, 1931.

HSU, S. M,; RAINE, L.; FANGER, F. A. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol**., v.75, n.5, p.734-738, 1981.

INAGAWA S., et al. Expression and prognostic roles of beta-catenin in hepatocellular carcinoma: correlation with tumor progression and postoperative survival. **Clin Cancer Res**, v.8, p.450-456, 2002.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Incidência de Câncer no Brasil, 2012. Disponível em: www.inca.gov.br.

IRIGARAY, P.; BELPOMME, D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 135-148, 2010.

ITOH, T., et al. Inducible expression of Wnt genes during adult hepatic stem/progenitor cell response. **FEBS Lett**, v.583, p.777-781, 2009.

KANUNFRE, C.C., et al. Ciglitizone and 15d PGJ2 induce apoptosis in Jurkat and Raji cells. **Int Immunopharmacol**., v.04, n.09, p.1171-1185, 2004.

KASTAN, M. B., et al. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v.75, p.1947-1950, 1990.

KLAUNING, J. E.; KLAMENDULIS, L. M.; XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Hum. Exp. Toxicol**., v.19, n.10, p.543-555, 2000.

KONG, A. T., et al. Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. **Mutation Research**, v.480-481, p.231-241, 2001.

LI, T., et al. ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome. **Laboratory Investigation**, v.90, p.234-244, 2010.

LI, Y., et al. Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. **J Nutr Biochem**, v.11, 2011.

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

LIM, I. K. Spectrum of molecular changes during hepatocarcinogenesis induced by DEN and other chemicals in Fisher 344 male rats. **Mechanisms of Aging and Development**, v.123, n.12, p.1665-1680, 2002.

LINGALA, S., et al. Immunohistochemical Staining of Cancer Stem Cell markers in Hepatocellular Carcinoma. **Exp Mol Pathol**, v.89, n.1, p.27-35, 2010.

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

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

MA, S., et al. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. **Mol. Cancer Research**, v.6, n.7, p.1146-53, 2008.

MARQUARDT, J. U.; THORGEIRSSON, S. S. Stem Cells in Hepatocarcinogenesis: evidence from genomic data. **Seminars in Liver Disease**, v.30, n.1, 2010.

MARQUARDT, J. U.; FACTOR, V. M.; THORGEIRSSON, S. S. Epigenetic regulation of cancer stem cells in liver cancer: Current concepts and clinical implications. **Journal of Hepatology**, v.53, p.568-577, 2010.

MISHRA, L., et al. Liver Stem Cells and Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**, v.49, n.1, p.318-329, 2009.

MO, H.; ELSON, C. E. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids. **Journal of Nutrition**, v.129, n.4, p.804-813, 1999.

MO, H.; ELSON, C. E. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. **Exp. Biol Med**., v.229, n.7, p.567-585, 2004.

MOREB J. S. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. **Curr Stem Cell Res Ther**., v.3, n.4, p. 237-246, 2008.

MORENO, F. S., et al. Inhibitory effects of beta-carotene on preneoplastic lesions induced in wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v.12, n.10, p.1817-1822, 1991.

MORENO, F. S., et al. Effect of beta-carotene on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. **Cancer Letters**, v.96, n.2, p.201-208, 1995.

MORENO, F. S., et al. The inhibitory effects of β-carotene and vitamin A during the progression phase of hepatocarcinogenesis involve inhibition of cell proliferation but not alterations in DNA methylation. **Nutr. Cancer**, v.44, p.80-8, 2002.

MORIMURA, S., et al. Trans-activation of glutathione transferase P gene during chemical hepatocarcinogenesis of the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci**., v.90, n.5, p. 2065–2068, 1993.

MOTOLA-KUBA D., et al. Hepatocellular carcinoma. An overview. **Annals of Hepatology**, v.5, p. 16-24, 2006.

NAGY, P.; BISGGARD, H. C.; THORGEIRSSON, S. S. Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. **J Cell Biol**., v.126, n.1, p.223-233, 1994

NAVES, M. M. V.; MORENO, F. S. Diferenciação Celular: Importância na Hepatocarcinogênese e Papel Modulador do ß-Caroteno. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.46, n.4, p.389-399, 2000.

NAVES, M. M. V., et al. Effects of β-carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat. **Journal of Nutritional Biochemistry,** v.12, p. 685-692, 2001.

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

ODOUX, C., et al. A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer. **Cancer Research**, v.68, n.17, p.6932-6941, 2008.

OHASHI, K., et al. Enhancement of N-nitrosodiethylamine initiated hepatocarcinogenesis caused by a colchicines-induced cell cycle disturbance in partially hepatectomized rats. **Cancer Research**, v.56, n.15, p.3474-3479, 1996.

OHLSON, L. C. E.; KOROXENIDOU, L.; HALLSTROM, I. P. Inhibition of in vivo rat regeneration by 2-acetyllaminofluorene affects the regulation of cell cycle-related proteins. **Hepatology**, v.27, p.691-696, 1998.

OISHI, N.; WANG, X. W. Novel therapeutic Strategies for Targeting Liver Cancer Stem Cells. **International Journal of Biological Sciences**, v.07, n.05, p.517-535, 2011.

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

ONG, T. P., et al. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. **Carcinogenesis**, v.27, n.6, p.1194-1203, 2006.

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

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

PITOT, H. C., et al. Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. **Toxicol. Pathol**., v.24, p.119-128, 1996.

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

PITOT H.C. Adventures in hepatocarcinogenesis. **Annual Review of Pathology**, v. 2, p. 1-29, 2007.

RIBEIRO, L. R., et al. Brazilian natural dietary components (annatto, propolis and mushrooms) protecting against mutation and cancer. **Hum Exp Toxicol**., v.25, n.5, p.267-272, 2006.

RIZZI, M. B. S. L., et al. β-carotene inhibits persistent and stimulates remodeling ygt-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. **Internat. J. Vit. Nutr. Res**., v.67, p.415-422, 1997.

ROSKAMS, T. Relationships among stellate cell activation, progenitor cells, and hepatic regeneration. **Clin. Liver Dis**., v.12, p.853-860, 2008.

ROSS, S. A. Nutritional genomic approaches to cancer prevention research. **Exp Oncol**, v.29, p.250–256, 2007.

SACCHETTINI, J. C.; POULTER, C. D. Creating isoprenoid diversity. **Science**, v.277, n.5333, p.1788-1789, 1997.

SEMPLE-ROBERTS, E., et al. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **Int. J. Cancer**, v.40. n.5, p.643-645, 1987.

SHUKLA Y.; KALRA N. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. **Cancer Letters**, v. 247, p. 167-181, 2007.

SILVEIRA, E. R., et al. Vitamin A and all-trans and 9-cis retinoic acids inhibit cell proliferation during the progression phase of hepatocarcinogenesis in Wistar rats. **Nutrition and Cancer**, v.39, n.2, p.244-251, 2001.

SPORN, M. B., et al. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Fed. Proc**., v.35, n.6, p.1332-1338, 1976.

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

STERMER, B. A.; BIANCHINI, G. M.; KORTH, K. L. Regulation of HMG-Coa reductase activity in plants. **J. Lipid. Res**., v.35, p. 1133-1140, 1994.

SU, Q., et al. Laminin induces the expression of cytokeratin 19 in hepatocellular carcinoma cells growing in culture. **World J Gastroenterol**, v.9, n.5, p. 921-929, 2003.

TATEMATSU, M.; NAGAMINE, Y.; FARBER, E. Redifferentiation as a Basis for Remodeling of Carcinogen-induced Hepatocyte Nodules to Normal Appearing Liver. **Cancer Research**, v.43, p.5049-5058, 1983.

TENG, Y., et al. Wnt/beta-catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.392, p.373-379, 2010.

TONG, C. M.; MA, S.; GUAN, X.Y. Biology of hepatic cancer stem cells. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.26, p.1229-1237, 2011.

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

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nat. Med**., v.10, n.8, p.789-799, 2004.

WEI, W.,et al. Blockade of Wnt-1 signaling leads to anti-tumor effects in hepatocellular carcinoma cells. **Mol. Cancer**, v.8, n.76, 2009.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for morphometric study of the lung and others organs, **Lab. Invest**, v.12, p.131-155, 1963.

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

WOOD, G. A.; SARMA, D. S.; ARCHER, M. C. Resistance to the promotion of gluthathione S-transferase 7-7-positive liver lesions in Conpenhagem rats. **Carcinogenesis**, v.20, n.7, p.1169-1175, 1999.

World Health Organization (WHO)/International Agency for Research on Cancer – IARC. World Cancer Report 2008 1:12-30, 2008.

World Health Organization (WHO). Cancer Fact Sheet, Fact sheet N°297, February 2009.

XU, C., et al. Genome-wide expression profiling of hepatic oval cells after partial hepatectomy in rats. **Tissue and Cell**, v.43, p.291-303, 2011.

YANG, W., et al. Wnt/β-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. **Cancer Research**, v.68, n.11, p.4287-4295, 2008.

YOO, J. S. H.; GUEGERICH, F. P.; YANG, C. S. Metabolism of n-nitrosodialkylamines by human liver microssomes. **Cancer Research**, v.48, p.1499-1505, 1988.

YOUNG, M. R.; YANG, H. S.; COLBURN, N. H. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kappa B and Pdcd4. **Trends. Mol. Med**., v.9, n.1, p. 36-41, 2003.

ZHANG, M.; THORGEIRSSON, S. S. Modulation of connexins during differentiation of oval cells into hepatocytes. **Experimental Cell Research**, v.213, p.37-42, 1994.