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

Versão Original

Efeito quimiopreventivo da β -ionona na
hepatocarcinogênese associada ao desenvolvimento de
esteatose hepática não alcoólica em ratos *Wistar*

Mayara Lilian Paulino Miranda

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

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

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

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

Miranda, Mayara Lilian Paulino
M672e Efeito quimiopreventivo da β -ionona na hepatocarcinogênese
associada ao desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica
em ratos *Wistar* / Mayara Lilian Paulino Miranda. -- São Paulo,
2015.
80p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Moreno, Fernando Salvador

I. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2. Carcinogêneses
animal I. T. II. Moreno, Fernando Salvador, orientador.

641.1 CDD

Mayara Lilian Paulino Miranda

Efeito quimiopreventivo da β -ionona na hepatocarcinogênese associada ao desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica em ratos *Wistar*

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno

orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015

Resumo

MIRANDA, M. L. P. Efeito quimiopreventivo da β -ionona na hepatocarcinogênese associada ao desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica em ratos Wistar. 2015. 80p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Dentre as neoplasias primárias que acometem o fígado, o carcinoma hepatocelular (HCC) é a mais frequente. Diversos fatores de risco predis põem ao HCC, entre eles a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). Segundo estudos prévios do grupo, a β -ionona (BI), apresenta potencial quimiopreventivo na hepatocarcinogênese, promovendo redução de lesões preneoplásicas (LPN). Assim pretendeu-se investigar se a NAFLD potencializaria o desenvolvimento de LPN em ratos *Wistar* submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH) na etapa de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese e se a BI apresenta efeito quimiopreventivo nesse contexto. Para tanto, os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais: grupo não-tratado (NT), grupo submetido ao RH (RH), grupo submetido ao RH e ao modelo de NAFLD, que consiste na administração de emulsão hiperlipídica, (AS) e grupo AS tratado com BI (AS + BI). Em uma primeira instância, 5 animais pertencentes aos grupos NT, AS, AS + BI foram eutanasiados após 6 semanas de administração de emulsão hiperlipídica, antes da aplicação do modelo RH, para se confirmar o desenvolvimento da NAFLD. Foi possível observar que a administração de emulsão hiperlipídica durante 6 semanas foi suficiente para o desenvolvimento de esteatose hepática. Após as 6 semanas foi introduzido o modelo do RH concomitante à administração da emulsão hiperlipídica até o fim do experimento na 13ª semana. Após 13 semanas o grupo AS apresentou maiores ($p < 0,05$) valores de focos de inflamação, hepatócitos balonizados e grau de esteatose hepática em relação ao grupo AS+BI, assim como maiores ($p < 0,05$) níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol, HDL, LDL, VLDL, e maior ($p < 0,05$) valor de MDA em relação ao grupo RH embora sem diferença estatística. O grupo AS também apresentou maior ($p < 0,05$) incidência, número total e multiplicidade de nódulos, além de maior ($p < 0,05$) número e tamanho de LPN persistentes (pLPN) e índice de proliferação quando comparado aos grupos RH e AS+BI. O grupo AS + BI, por sua vez, demonstrou menores ($p < 0,05$) valores de escore de células ovais e menores valores de comprimentos de cometa e danos no DNA quando comparado ao grupo AS, embora sem diferença estatística para este último parâmetro. Em relação à expressão gênica, o grupo AS apresentou menores ($p < 0,05$) valores de expressão do gene *Hmgcr* em relação ao grupo RH e maiores ($p < 0,05$) valores dos genes *Insig 1* e *Thy 1* quando comparados ao grupo AS+BI. Portanto, no contexto de esteatose hepática associada ao modelo do RH, a administração de BI durante a etapa de iniciação/promoção em ratos *Wistar* resultou em atividade quimiopreventiva que se deu pela diminuição de pLNP, redução da proliferação celular e do número de células ovais, consideradas potenciais alvos para o desenvolvimento da hepatocarcinogênese, entretanto os genes analisados parecem não serem modulados pela BI.

Palavras chave: hepatocarcinogênese, NASH, quimioprevenção, beta - ionona

Abstract

MIRANDA, M. L. P. Chemopreventive effect of β -ionone in hepatocarcinogenesis associated with the development of hepatic steatosis non alcoholic in Wistar rats. 2015. 80p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Cancer is a major public health problem in the world. Among the primary neoplasms affecting the liver, hepatocellular carcinoma (HCC) is the most frequent. Several risk factors predispose to HCC, including the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). According to previous studies of the group, the β -ionone (BI), has potential chemopreventive in hepatocarcinogenesis, promoting reduction of preneoplastic lesions (LPN). Thus we investigated whether NAFLD would increase the development of LPN in Wistar rats resistant hepatocyte model (RH) at the stage of initiation / promotion of hepatocarcinogenesis and if BI has chemopreventive effect in this context. Therefore, the animals were divided into 4 groups: non-treated group (NT), the group submitted to HR (HR), the group submitted to HR and NAFLD model, consisting of the fatty emulsion administration (AS) and AS group treated with BI (AS + BI). In a first point, 5 animals belonging to the groups NT, AS, AS + BI were euthanized after 6 weeks of administration of fat emulsion prior to application of the HR model, to confirm the development of NAFLD. It was observed that the administration of fatty emulsion for 6 weeks was sufficient to the development of hepatic steatosis. After 6 weeks it was introduced into the model HR the concomitant administration of fatty emulsion until the end of the experiment at 13 weeks. In the endpoint, the AS group had higher ($p < 0.05$) of serum triacylglycerols, cholesterol, HDL, LDL, VLDL although no statistical difference in relation to RH group, and increased ($p < 0.05$) amount of MDA in relation to the group RH. The AS group also had higher ($p < 0.05$) incidence, multiplicity and total number of nodes and greater ($p < 0.05$) number and size of persistent LPN (pLPN) and proliferation index when compared to HR groups and AS + BI. AS + BI group. It was observed in AS+BI group lower ($p < 0.05$) cell oval score values compared to AS group. In addition the AS+BI group showed lower values of the comet length and DNA damage compared to the AS group, although no statistical differences. In relation to gene expression, the AS group showed lower ($p < 0.05$) HMGCR gene expression values in relation to HR group and higher ($p < 0.05$) expression of Insig genes 1 and Thy 1 compared to group AS + BI. Therefore, in the context of hepatic steatosis associated with HR model BI for administration to the stage of initiation / promotion in rats resulted in chemopreventive activity was due to decrease in area of pLNP, reducing cell proliferation, and the number of oval cells, as potential targets for the development of hepatocarcinogenesis, however the genes do not seem to be modulated analyzed by BI.

Keywords: hepatocarcinogenesis, NASH, chemoprevention beta - ionone.

A Dirce Buglia dos Santos (In Memoriam)
querida avó que influenciou meus caminhos
e ainda está presente em minha vida.

Agradecimentos

À Deus, no qual encontro tranquilidade e fé para seguir.

À minha família pelo apoio dado a cada passo da jornada. Aos meus pais Silvana e Mauro, obrigada por toda compreensão e por serem meu porto seguro, meus maiores exemplos de determinação e garra. Aos meus irmãos Arthur e Marcel, obrigada pelo apoio de vocês e por me ajudar em todos os momentos. Ao meu querido avô José Paulino, obrigada por me incentivar e apoiar sempre. A vocês meu amor incondicional.

Ao professor Fernando Salvador Moreno, meu orientador, por me receber e acolher em seu laboratório. Obrigada por compartilhar o seu conhecimento, pelos desafios que só me fizeram ir mais longe. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com uma referência em pesquisa e por tudo que me ensinou como profissional e ser humano.

À pos-doutoranda Kelly Silva Furtado, minha eterna mammy, que foi sem dúvida parte essencial desta etapa em minha vida. Uma verdadeira mãe que ensina e cuida, que nos impulsiona para frente sempre. Por ela tenho um profundo carinho e admiração.

À pos-doutoranda Fábiana de Oliveira Andrade por me entender verdadeiramente, compartilhar todo o nervosismo e ter tanta

paciência comigo. Obrigada pelo apoio e por ser alguém que eu pude contar sempre.

Ao professor Luís Fernando Barbisan e a Renata Goto pelo auxílio nas análises histológicas e marcações de imunoistoquímica.

À professora Dra. Inar Alves Castro e a Marina Nogueira, por ceder o laboratório e todo o auxílio prestado durante as análises de MDA.

Ao professor Eduardo Purgatto pela ajuda na análise de quantificação de beta-ionona.

Ao técnico do laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer, Renato Heidor por toda a ajuda na análise de cometa.

*Aos meus colegas do laboratório de **Dieta, Nutrição e Câncer**, que direta ou indiretamente, me auxiliaram nessa jornada, obrigada pela troca de experiências, pelas conversas intermináveis e pelo riso sempre presente.*

Aos meus queridos Paulo Eduardo, Juliana e Laura, minha família dentro do laboratório. Agradeço a vocês por me acolher e por poder contar com vocês em todos os momentos. Ao Roberto e Ernesto, obrigada por toda a ajuda durante e depois do biotério, pelas experiências trocadas, o incentivo e paciência de vocês.

Às minhas queridas amigas Camile, Luiza, Mariana, Raquel, Marina, Bianca, Graziela, Janaína e Kelcylene, meu muito obrigada por toda a ajuda e paciência nos momentos de crise. Com vocês essa etapa se tornou certamente única. Obrigada pelas risadas, pelos

conhecimentos e apoio de cada uma de vocês. Vocês com certeza foram essenciais nessa jornada.

Ao meu companheiro Henrique Cardone, a pessoa mais paciente do universo. Obrigada por todo o incentivo, pela ajuda nos momentos difíceis e por estar sempre ao meu lado. Sem você, esse momento não seria possível.

À Ligia Carreli, amiga presente durante toda a jornada, obrigada por me compreender e apoiar sempre.

Aos demais professores e colegas do departamento, pela ajuda e suporte ao longo desta jornada. A minha querida Lurdinha, por tentar manter a ordem no laboratório, por cuidar do departamento e pelos deliciosos cafés.

Aos queridos Cléo, Edílson, Mônica e Roberta, do B14, que jamais exitaram em ajudar. Aos funcionários do biotério, pelos cuidados despendidos com os animais e pelo suporte que me foi dado nesta fase.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio na forma de bolsa de mestrado para o desenvolvimento deste projeto.

*“ E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas*

*E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá*

*E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho por mais que pense estar*

*É tão bonito quando a gente pisa firme
Nessas linhas que estão nas palmas de nossas mãos*

*É tão bonito quando a gente vai à vida
Nos caminhos onde bate, bem mais forte o coração*

E aprendi ...”

(Caminhos do coração –Gonzaguinha.)

Sumário

Resumo	Erro! Indicador não definido.
Lista de Figuras	15
Lista de Tabelas.....	15
1.Introdução.....	18
1.1. Epidemiologia	19
1.2. Hepatocarcinogênese	19
1.3. Associação entre NAFLD e HCC	22
1.4. Quimioprevenção e β -ionona.....	24
2. Objetivo	26
3. Material e Métodos.....	26
3.1. Animais	26
3.2. Indução de NAFLD.....	27
3.3. Modelo do “Hepatócito Resistente”.....	27
3.4. Protocolo experimental	28
3.5. Eutanásia dos Animais e coleta das amostras	30
3.6. Determinação da presença e do grau de NAFLD	31
3.7. Teste de tolerância à glicose (GTT).....	31
3.8. Determinação do Perfil Lipídico.....	32

3.9. Determinação de malonildialdeído (MDA) no fígado.....	32
3.10. Quantificação de β I no fígado.....	33
3.11. Exame Macroscópico dos fígados	34
3.12. Marcação imunoistoquímica para GST-P e KI-67.	34
3.12.1. Procedimento para identificação e quantificação de LPN GST-P positivas	34
3.12.2. Quantificação da proliferação celular	35
3.13. Quantificação de células ovas.....	35
3.14. Quantificação da apoptose	35
3.15. Avaliação de danos no DNA hepático	35
3.16 Avaliação da expressão gênica de Thy 1, Insig 1 e Hmgcr por RT - qPCR.	36
3.17. Análise estatística dos dados.....	37
4.RESULTADOS	39
4.1. Determinação da presença de NAFLD	39
4.1.1. Evolução do peso corpóreo e do consumo de ração dos animais submetidos a 6 semanas de emulsão hiperlipídica	39
4.1.2. Peso corpóreo inicial e final, hepático absoluto e relativo dos animais submetidos a 6 semanas de emulsão hiperlipídica	40
4.1.3. Análise histológica do fígado dos animais submetidos a 6 semanas de emulsão hiperlipídica.....	41

4.1.4. Teste de tolerância à glicose dos animais submetidos a 6 semanas de emulsão hiperlipídica.	42
4.2. Associação de NAFLD e modelo do RH.....	43
4.2.1. Evolução do peso corpóreo e do consumo de ração dos animais submetidos a 13 semanas de experimento	44
4.2.2. Pesos corpóreos inicial e final, hepático absoluto e o relativo dos animais submetidos a 13 semanas de experimento.....	45
4.2.3. Análise histológica do fígado dos animais submetidos a 13 semanas de experimento	46
4.2.4. Teste de tolerância à glicose dos animais submetidos a 13 semanas de experimento	47
4.2.5 Níveis séricos de triglicerídeos, colesterol, HDL, LDL e VLDL dos animais submetidos a 13 semanas de experimento.	48
4.2.6 Níveis hepáticos de MDA dos animais submetidos a 13 semanas de experimento.....	49
4.2.7 Níveis hepáticos de BI nos animais submetidos a 13 semanas de experimento.....	50
4.2.8 Macroscopia dos animais submetidos a 13 semanas de experimento.....	51
4.2.9. Morfometria dos animais submetidos a 13 semanas de experimento.....	51
4.2.10 Proliferação celular no fígado dos animais submetidos a 13 semanas de experimento	52

4.2.11 Células ovais dos animais submetidos a 13 semanas de experimento.....	53
4.2.12 Apoptose no fígado dos animais submetidos a 13 semanas de experimento.....	54
4.2.13 Dano no DNA no fígado dos animais submetidos a 13 semanas de experimento.....	55
4.2.14 Expressão gênica de <i>Thy 1</i> , <i>Insig 1</i> , e <i>Hmgcr</i> dos animais submetidos a 13 semanas de experimento	56
5. Discussão.....	57
6.Conclusão	63
7. Referências.....	63
Anexo 1	77
Anexo 2	7778

Lista de Figuras

Figura 1: Delineamento experimental.	30
Figura 2: Evolução do consumo de ração (g)/100g p.c. dos animais dos grupos não tratado (NT) ou submetidos por 6 semanas à emulsão hiperlipídica (AS) e tratados com BI (AS+BI); n=5. Dados expressos como média e desvio padrão a – diferente de NT.	40
Figura 3: Grau de esteatose (A), número de hepatócitos balonizados (B), número de focos de inflamação (C) analisados em H&E em ratos Wistar submetidos por 6 semanas à emulsão hiperlipídica (AS) e tratados com BI (AS + BI). Dados expressos como média $\pm$ EPM, a- diferente de AS ($p<0,05$) ANOVA seguido de teste de Duncan (n=5).	42
Figura 4 :Teste de Tolerância a Glicose (GTT) em ratos Wistar não tratados (NT) ou submetidos por 6 semanas à emulsão hiperlipídica (AS) e tratados com BI (AS+BI). n=5. Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de NT b- diferente de AS ($p<0,05$) ANOVA seguida de teste de Duncan.	43
Figura 5: Evolução de peso corpóreo dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). DEN = dietilnitrosamina; 2AAF = 2-acetilaminofluoreno; HP = hepatectomia parcial a 70%.	44
Figura 6: Evolução do consumo de ração dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). DEN = dietilnitrosamina; 2AAF = 2-acetilaminofluoreno; HP = hepatectomia parcial a 70%.	45
Figura 7: Grau de esteatose (A), número de hepatócitos balonizados (B), número de focos de inflamação (C) analisados em H&E em ratos Wistar submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de AS ($p<0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.	47

Figura 8: Teste de Tolerância a Glicose (GTT) dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8).n=5.....	48
Figura 9: Concentrações hepáticas de MDA/100µg de proteína dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). Dados expressos como média ± EPM a - diferente de RH (p<0,05), ANOVA seguido de teste Duncan.....	50
Figura 10: Concentração hepática de beta ionona (BI) dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 5), a associação (AS n= 5) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n= 5).Dados expressos como média ± EPM a - diferente de AS (p<0,05), ANOVA seguido de teste Duncan.	50
Figura 11: Quantificação do índice de proliferação celular marcado com KI67 do fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8).n=8). Dados expressos como média ± EPM a - diferente de RH, b - diferente de AS (p<0,05), ANOVA seguida de teste de Duncan.	53
Figura 12: Escore de células ovas dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). Dados expressos como média ± EPM a - diferente de AS (p<0,05), ANOVA seguido de teste Duncan.....	54
Figura 13: Quantificação do índice apoptótico do fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). Dados expressos como média ± EPM a - diferente de RH, ANOVA seguido de teste Duncan.	55
Figura 14: Comprimento (µm) dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). Dados expressos como média ± EPM.	56
Figura 15: Expressão gênica relativa ao grupo NT (valor fixado em 1) de Thy 1, Insig 1, e Hmgcr dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). a-	

diferente de RH, b- diferente de AS + BI ($p < 0,05$), ANOVA seguida de teste de Duncan.....	57
--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1:Valores dos componentes da emulsão hiperlipídica de referência para 1 mL.....	27
Tabela 2:Evolução do peso corpóreo dos animais dos grupos não tratado (NT) ou submetidos por 6 semanas à emulsão hiperlipídica (AS) e tratados com BI (AS+ BI).....	39
Tabela 3: Pesos corpóreos iniciais e finais e hepáticos absoluto e relativo dos animais dos grupos não tratado (NT) ou submetidos por 6 semanas à emulsão hiperlipídica (AS) e tratados com BI (AS + BI)	41
Tabela 4: Pesos corpóreos iniciais e finais, hepático absoluto e relativo dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8).....	46
Tabela 5: Média dos parâmetros de perfil lipídico TG (Triacilgliceróis), colesterol, HDL, LDL e VLDL séricos dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8).....	49
Tabela 6: Incidência, número total, multiplicidade e tamanho de nódulos visíveis em dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n= 8).	51
Tabela 7: Análise morfométrica pela marcação com GST-P, demonstrando número de LPN por cm ² , tamanho médio das LPN (mm ²) e porcentagem de área hepática ocupada pelas mesmas de animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8).....	52

1.Introdução

1.1. Epidemiologia

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo (Siegel *et al.*, 2012). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com câncer (Inca, 2014).

Das neoplasias que acometem o fígado, o carcinoma hepatocelular (HCC) é a mais frequente. O número anual de novos casos de HCC em todo o mundo é mais de um milhão, tornando-se o quinto câncer mais comum no mundo e a terceira principal causa de morte relacionada à doença, precedido apenas pelas neoplasias de pulmão e do estômago (Freedman e Marrero, 2012; Waly *et al.*, 2012).

O HCC é um câncer de mau prognóstico e sobrevida média de apenas 6 meses após o diagnóstico, sendo que somente 5% dos pacientes sobrevivem por mais de 5 anos (Blonski *et al.*, 2010). Além disso, os procedimentos cirúrgicos, como a ressecção, ou o transplante hepático estão disponíveis apenas para 30% dos pacientes (Hoshida *et al.*, 2010), fazendo-se necessário o desenvolvimento de estratégias de prevenção (Buendia & Neuveut, 2015).

A frequência do HCC pode variar em virtude de diversos fatores de risco, como infecções pelos vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV), ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas, consumo crônico de bebidas alcoólicas, uso de tabaco, hemocromatose, radiação, exposição a substâncias químicas e esteatose hepática não alcoólica (Non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD) (Llovet *et al.*, 2003; El-Serag, 2011).

1.2. Hepatocarcinogênese

A transformação das células normais em malignas requer cerca de metade a 2/3 da vida das diferentes espécies (Farber, 1990), ou de 20 a 40 anos, especialmente no caso de neoplasias sólidas em humanos (Loeb *et al.*, 2003). A carcinogênese, processo pelo qual se desenvolve a neoplasia, envolve múltiplas etapas, destacado-se três etapas

básicas, a iniciação, a promoção e a progressão, cada uma com características morfológicas e moleculares distintas (Pitot, 2001).

A primeira etapa da carcinogênese, conhecida como iniciação, envolve modificações genéticas irreversíveis e permanentes na célula afetada (Hanahan e Weinberg, 2000; Pitot, 2001; Hanahan e Weinberg, 2011). A fixação do dano pela replicação do DNA, seguida de divisão celular converte o dano químico em alterações herdáveis denominadas mutações (Bertram, 2000). A etapa subsequente, chamada de promoção, é caracterizada pela expansão clonal das células iniciadas na presença contínua de um agente promotor, originando as lesões pré-neoplásicas (LPN) (Luch, 2005). Este estágio é reversível, apresenta grande período de latência e representa o principal alvo da ação de agentes quimiopreventivos (Pitot, 2001; 2007). A progressão da célula pré-maligna em maligna ocorre por divisão celular incontrolada, perda da estabilidade genética, aneuploidias, amplificações e deleções gênicas. Além disso, é irreversível (Pitot, 2007).

Modificações genéticas irreversíveis, como o dano no DNA, podem ser causadas por agentes químicos, físicos e biológicos como produtos químicos genotóxicos, radiação ionizante (IR) e ultravioleta (UV) e infecções de vírus como hepatite B e C. Estes agentes podem induzir, por exemplo, quebra de fita simples ou dupla fita, lesões de DNA, desaparecimento de bases de DNA e ligações cruzadas do DNA (Chen et al, 2015, Liu et al, 2015). Além de modificações genéticas, alterações epigenéticas também estão envolvidas no processo de carcinogênese em todos os estágios. Estas consistem em modificações estruturais em regiões genômicas que alteram a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA. Os principais tipos inter-relacionados de herança epigenética são a metilação do DNA, modificações nas histonas e a regulação da expressão gênica por microRNAs (Feinberg e Tycko, 2004, Sarnow et al., 2006).

Duas hipóteses têm sido propostas para explicar 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 (Nguyen et al, 2012); 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) (Oudoux *et al.*, 2008). Este grupo celular pode atuar tanto no desenvolvimento quanto na progressão neoplásica, além disso, possui marcadores próprios como, por exemplo, *Thy 1*. Este marcador é

reconhecido por atuar em diversos tipos de CSC, inclusive em células ovais reconhecidas como CSC do fígado em ratos (Meacham & Morrison, et al, 2013; Sukowati, et al 2013, Xu et al, 2015).

Na presença de estímulos proliferativos, como uma hepatectomia parcial, por exemplo, um compartimento de células tronco/progenitoras que dá origem às células ovais no fígado é ativado. Estas células podem se diferenciar em hepatócitos ou células epiteliais dos ductos biliares (colangiócitos) (Roskams, 2008; Mishra et al., 2009; Darwiche et al., 2011; Oishi & Wang, 2011). O estado proliferativo crônico poderia favorecer a transformação destas células imaturas, que interromperiam o processo de diferenciação em curso e se tornariam potencialmente neoplásicas, dando origem à neoplasia hepática (Naves e Moreno, 2000; Marquardt e Thorgeirsson, 2010).

Merece destaque que o padrão do desenvolvimento de neoplasias de fígado em ratos é semelhante ao processo observado em humanos (Andersen et al., 2010). Foram observadas semelhanças morfológicas, bioquímicas e biológicas em lesões pré neoplásicas (LPN) e neoplasias hepáticas em humanos e roedores. Isto indica que, independentemente dos fatores etiológicos, mecanismos básicos da hepatocarcinogênese em diferentes espécies podem ser similares (Bannasch *et al.*, 2003; Feo *et al.*, 2008). Nesse sentido, modelos de hepatocarcinogênese vêm sendo considerados importantes ferramentas para o estudo de LPN e neoplasias *in vivo*. Dentre eles, destaca-se o modelo do Hepatócito Resistente (RH) descrito em 1976 (Solt & Farber, 1976), modificado em 1987 (Semple-Roberts *et al.*, 1987) e adaptado para ratos *Wistar* em 1991 (Moreno *et al.*, 1991).

Este modelo é adequado para induzir elevada incidência de LPN, bem como para se avaliar e comparar os efeitos de substâncias quimiopreventivas ou carcinogênicas capazes de modular a carcinogênese (Silva-Oliveira *et al.*, 2010). O modelo do RH sincroniza as etapas da carcinogênese, o que permite avaliar suas etapas isoladamente. Cerca de 95-98% das LPN regredem e não evoluem para neoplasias, 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, fazendo com que o fígado retorne ao aspecto “normal” anterior. 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.*, 2008). Essas lesões podem ser identificadas pela

marcação da enzima γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT) (Feo *et al.*, 2008) ou glutathione S-transferase forma placentária (GST-P) (Higashi *et al.*, 2004; Feo *et al.*, 2008).

Deste modo, a hepatocarcinogênese é classificada como um processo complexo associado ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que ocorre durante as fases de iniciação, promoção e progressão (Zheng *et al.*, 2011).

1.3. Associação entre NAFLD e HCC

Alterações moleculares e fisiopatológicas causadas pela NAFLD podem levar ao desenvolvimento do HCC, aumentando a taxa de incidência e modificando o perfil epidemiológico do câncer hepático primário e metastático (Schulz *et al.*, 2015).

A NAFLD é um termo abrangente para um grupo de doenças definidas por esteatose em mais de 5% dos hepatócitos na ausência de consumo de etanol, considerando o consumo igual ou menor que 20 g de etanol para homens e 10 g para mulheres. A NAFLD pode variar de simples esteatose a sua forma mais grave, esteatohepatite não alcoólica (NASH) (Durazzo *et al.*, 2012, Clarke *et al.*, 2014). A prevalência de NAFLD afeta aproximadamente 30% da população em países industrializados e está aumentando em países em desenvolvimento devido à mudança de hábitos alimentares. Estima-se, ainda, que na obesidade mórbida há um risco aumentado de 90% de desenvolvimento de NAFLD (Dowman *et al.*, 2011, Leung *et al.*, 2015).

A esteatose hepática ocorre quando a taxa de importação ou síntese dos ácidos graxos por hepatócitos excede a taxa de exportação ou de catabolismo (Dowman *et al.*, 2010; Rozman, 2014). Em contraste com a esteatose simples, a NASH caracteriza-se pela inflamação na presença de esteatose, degeneração balonizante e inflamação lobular e portal com ou sem a presença de corpúsculos de Mallory e fibrose (Hebbard e George, 2011; Cusi, 2012).

O modelo de “2 impactos” proposto em 1998 por Day e James” tem sido proposto para explicar a transição de simples esteatose à NASH (Day e James, 1998; Takahashi *et al.*, 2012). Neste modelo a primeira agressão caracteriza-se pelo desenvolvimento de esteatose e consequente resistência hepática e periférica à insulina. Esta etapa pode ser revertida e não promove necessariamente a injúria no fígado (Hebbard e George, 2011; Takahashi *et al.*, 2012).

O segundo “impacto” englobaria a interação de processos que incluem lesão por estresse oxidativo, lesão hepática mediada por citocinas, hepatotoxicidade mediada por ácidos graxos livres (AGL), concentrações elevadas intra-hepáticas de colesterol, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipoadiponectinemia, e a apoptose, que resultam em necroinflamação e fibrose (Hebbard e George, 2011).

Entretanto, mais recentemente, a teoria dos “múltiplos impactos” foi sugerida para explicar a transição de NAFLD a NASH. Esta teoria se baseia no efeito da inflamação sistêmica envolvendo a interação de processos inflamatórios entre o fígado, intestino e tecido adiposo com consequente alteração do metabolismo desses órgãos (Tilg & Moschen, 2010, Yilmaz, 2012).

De todo o modo, a transição da esteatose para NASH representa um importante passo na patogênese desta afecção, que pode progredir para cirrose e falência hepática, estando associada ao aumento do risco de desenvolvimento de HCC (Bieghs *et al.*, 2012; Guerrerio *et al.*, 2012; Rozman, 2014).

Existe uma variedade de modelos experimentais com animais que utiliza alterações genéticas e de padrões de alimentação para o estudo de NAFLD (Larter e Yeh, 2008). A maioria dos modelos experimentais alimentares foca-se em prover um consumo que cause dano hepático (Hebbard e George, 2011), tanto com rações hiperlipídicas como com hipercalóricas (Takahashi *et al.*, 2012). Um modelo adequado para estudo deve ser prático para a investigação experimental, bem como apresentar características que definam a condição humana. (Larter e Yeh, 2008; Sun e Karin, 2012).

Na revisão de Hebbard e George (2011) foram analisados modelos relevantes para o estudo da NAFLD, dentre estes merece destaque o modelo experimental de Zou et al, 2006, em que ratos foram distribuídos em dois grupos alimentados com ração acrescida de solução salina (grupo controle) ou 1 mL de emulsão lipídica (grupo tratado) por 100 g p.c., via intra-gástrica, durante 6 semanas. Os animais apresentaram aumento sérico de colesterol total, triacilgliceróis e TNF- α (fator alfa de necrose tumoral), hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência à insulina, lesões mitocondriais e inflamação hepática.

A combinação dos impactos gerados pela NAFLD no fígado sobrecarrega mecanismos de sobrevivência de hepatócitos aumentando a taxa de mortalidade dos mesmos. Esse processo leva à ativação de meios para substituir essas células, como a

ativação de células estreladas hepáticas em miofibroblastos, causando fibrose hepática, e a promoção da expansão de células ovais que produzem citocinas inflamatórias para recrutar diversos tipos de células imunes para o fígado (Jou *et al.*, 2008). Assim, as células ovais ou progenitoras hepáticas podem apresentar não só relação com a NAFLD como também com a origem do HCC a partir desta (Kikuchi *et al.*, 2014).

1.4. Quimioprevenção e β -ionona

Existem evidências de que a alimentação exerce papel fundamental na modulação de todos os estágios da carcinogênese, destacando-se entre outros fatores de risco (Surh, 2003; Ross, 2010). Nesse sentido, diversos estudos buscam elucidar como determinados alimentos e compostos bioativos presentes nos alimentos (CBAs) podem interferir no processo, com o objetivo de reduzir o risco de desenvolvimento de neoplasias (Sporn, 1976; Ross, 2007).

Deste modo, a quimioprevenção pode ser uma estratégia promissora para o controle de neoplasias e é definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos, com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de desenvolvimento de neoplasias (Sporn *et al.*, 1976; Shukla e Kalra, 2007). Diversos nutrientes e CBAs apresentam potencial ação quimiopreventiva na hepatocarcinogênese (Heidor *et al.*, 2012; De Conti *et al.*, 2013; Scolastici *et al.*, 2014). Dentre os inibidores da carcinogênese identificados até o momento, podem-se citar alguns derivados do metabolismo do mevalonato em plantas, denominados isoprenóides, em função de sua promissora ação relatada na quimioprevenção (Moreno *et al.*, 1995; Mo e Elson, 2004; De Moura Espindola *et al.*, 2005; Cardozo *et al.*, 2011a; ONG *et al.*, 2012; Scolastici *et al.*, 2014)

Um dos isoprenóides que merece destaque é a beta-ionona (BI) que é um sesquiterpeno presente na estrutura molecular do retinol, β -caroteno (BC) e ácido retinóico e pode ser encontrada em uvas e aromatizantes de vinhos (Cardozo *et al.*, 2011a; Scolastici *et al.*, 2014). A BI é conhecida por atuar em diversas atividades; dentre estas destacam-se sua ação quimiopreventiva e antioxidante (Asokkumar *et al.*, 2012).

Esta apresentou atividade quimiopreventiva em diversos tipos de neoplasias; entretanto, seu mecanismo de ação é pouco conhecido (Janakiram *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013). Em trabalhos prévios, observou-se atividade quimiopreventiva da BI quando administrada durante as fases de iniciação e promoção inicial da hepatocarcinogênese em ratos *Wistar* submetidos ao modelo do RH. Esta atividade da BI foi atribuída à inibição da proliferação celular nas LPN e nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN (De Moura Espindola *et al.*, 2005). De forma semelhante, atividade quimiopreventiva da BI foi observada também quando administrada somente durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos *Wistar*, devido à redução da proliferação celular em LPN, à indução da remodelação de LPN (Cardozo *et al.*, 2011a). Outros estudos também observaram que a BI foi capaz de inibir a atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMGCR), essencial para a síntese do colesterol (Yu *et al.*, 1994). Assim, de forma semelhante ao BC (Moreno *et al.*, 1995), a capacidade da BI em reduzir a síntese do colesterol poderia estar relacionada à inibição da HMGCR, reduzindo, também, a síntese de intermediários da via do mevalonato, tais como pirofosfato de farnesila e geranilgeranila (De Moura Espindola *et al.*, 2005; Cardozo *et al.*, 2011a; Scolastici *et al.*, 2014). A primeira etapa na biossíntese de colesterol em animais é um conjunto de reações que se inicia com a formação de HMGC que é reduzida a mevalonato, sendo nesta etapa necessária a ação da enzima HMGCR (Goldstein e Brown, 2009). Esta está diretamente associada ao desenvolvimento de NAFLD (Simonen *et al.*, 2013). LPNs e neoplasias hepáticas apresentam perda do mecanismo de regulação inibitório da atividade da enzima HMGCR (Siperstein, 1984).

Outro mecanismo que também influencia os níveis de HMGCR compreende a ação dos genes *Insigs*. Estes foram originalmente identificados em 1991 como genes induzidos pelo tratamento com insulina em células de H35 hepatoma. O nome é derivado de sua descrição, em inglês, gene induzido por insulina (*insulin induced gene*) (Burg e Espenshade, 2011) e são responsáveis por se ligar as proteínas SCAP quando há o excesso de esteróis, impedindo a ativação de SREBPs e, consequentemente, reduzindo a transcrição de genes relacionados a síntese de lipídios como a *Hmcg* (Tsai *et al.*, 2012). Desse modo, os genes *Insig* apresentam-se como um mecanismo relevante no controle dessa enzima de fundamental importância na patogenia da NAFLD.

Como exposto, a BI parece atuar em mecanismos do desenvolvimento de HCC, bem como na síntese do colesterol, o qual está diretamente relacionada à NAFLD. Assim, este isoprenóide poderia, eventualmente, apresentar ações preventivas na hepatocarcinogênese potencializada pelo desenvolvimento de NAFLD.

O fato de que o desenvolvimento de NAFLD constitui um fator associado à hepatocarcinogênese faculta-nos a hipótese de que a NAFLD contribuiria para a potencialização desse processo, inclusive, por meio do aumento do número de células ovas nas etapas de iniciação/promoção. Além disso, aventa-se a possibilidade da BI atuar como quimiopreventivo no processo de hepatocarcinogênese associada ao desenvolvimento de NAFLD.

2. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo investigar se a NAFLD potencializa o desenvolvimento de LPN em ratos *Wistar* submetidos ao modelo do RH na etapa de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese, bem como se a administração de BI apresenta atividade quimiopreventiva na associação entre NAFLD e RH (AS).

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem *Wistar*, com pesos iniciais compreendidos entre 90 e 110 g e obtidos da colônia do biotério da Universidade de São Paulo (USP-SP). FCF/IQ-USP. O experimento foi realizado nas dependências do biotério, após a devida aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais de Experimentação (Protocolo nº 418).

Os animais permaneceram durante todo o experimento nas seguintes condições: temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de iluminação claro-escuro de 12h, iniciando-se às 7hrs. Foram mantidos em gaiolas de polipropileno (não excedendo a 5 animais por caixa) com tampas de aço inoxidável e assoalho forrado com maravalha previamente esterilizada, trocada rotineiramente em dias alternados. Esses tiveram acesso à água filtrada e ração comercial peletizada para roedores de laboratório (Nuvilab CR-1;

Nuvital Nutrientes S/A; Colombo/PR; Brasil) *ad libitum*, com controle de consumo de ração e massa corpórea diariamente. Os animais receberam o mesmo lote de ração do início até o término do experimento.

3.2. Indução de NAFLD

Após uma semana de adaptação, os animais receberam, diariamente, além da ração, 1 mL por 100 g de peso corpóreo de emulsão hiperlipídica via gástrica (i.g.) para indução de NAFLD durante todo o período do experimento, segundo modelo estabelecido por Zou et al (2006). A composição dessa emulsão se encontra na **Tabela 1**.

Tabela 1:Valores dos componentes da emulsão hiperlipídica de referência para 1 mL.

Componentes	Quantidade/Litro	Emulsão (1 mL)
Água destilada (mL)	300	0,3
Colesterol (g)	100	0,1
Desoxicolato de sódio (g)	10	0,01
Leite em pó total (g)	80	0,08
Mix de minerais (g)	1,5	0,0015
Mix de vitaminas (g)	2,5	0,0025
Óleo de milho (g)	400	0,4
Propileno glicol (g)	31,1	0,0311
Sacarose (g)	150	0,15
Sal de cozinha (g)	10	0,01
Tween 80 (g)	36,4	0,0364
Total energético (kcal)	4342	4,342

3.3. Modelo do “Hepatócito Resistente”

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

Após 6 semanas de tratamento com a emulsão hiperlipídica a iniciação da carcinogênese ocorreu pela administração i.p. de dose necrogênica do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN; Sigma, EUA; 20 mg/100 g de peso corpóreo [p.c.]) dissolvido

em solução de NaCl a 0,9%. Após um período de recuperação de 2 semanas os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses únicas em dias consecutivos, por intubação gástrica, de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF; Sigma; 1,5 mg/100 g 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 (HP) a 70%. Para isto, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com éter etílico (Merck, Brasil). No pós-operatório os animais receberam ácido acetilsalicílico 100 mg/kg via oral, misturado na água, como analgésico durante 3 dias.

Por fim, no quarto dia que sucedeu a HP os animais receberam via i.g. dose de 2-AAF (1 mg / 100 g p.c.) também dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho e foram eutanasiados na 13^a semana pós início da indução da NAFLD.

3.4. Protocolo experimental

Após um período de aclimação de 07 dias, 58 animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais. Segue representação esquemática da distribuição dos animais, bem como, os diferentes protocolos de tratamento (**Figura 1**).

Grupo NT: Não tratado, foi composto por animais que não foram submetidos ao modelo do RH e nem à administração da emulsão hiperlipídica. Esses animais permaneceram nas mesmas dependências e passaram pelos mesmos estímulos de estresse que os demais grupos: administração de água diariamente (1 mL/100g peso corpóreo) via intra-gástrica (i.g.) durante todo o experimento (fase de iniciação/promoção) como controle da aplicação da emulsão hiperlipídica; solução salina via intraperitoneal (i.p.) (20mg/100g p.c.) como controle da aplicação de DEN; 4 administrações de água via i.g. de 1,5 mL por animal como controle da administração de 2-AAF; *sham operation*, como controle da hepatectomia e 1 dose de água via i.g. de 1 ml por animal como controle da aplicação da 4^o dose de 2-AAF e eutanasiados na 13^a semana.

Grupo RH: Composto de animais que receberam, diariamente, 1 mL / 100g peso corpóreo de água via i.g. durante todo o experimento como controle da administração de

emulsão hiperlipídica. Na 6ª semana receberam aplicação i.p. de DEN (20mg/100g p.c.). Na 8ª semana, esses animais receberam 4 doses de 2-AAF (1,5 mg/100g p.c.) via i.g. Depois da quarta dose de 2-AAF, foram submetidos à hepatectomia parcial (HP) 70 % e a mais uma dose de 2-AFF de 1 mg/100g p.c. via i.g. no 4º dia pós HP e eutanasiados na 13ª semana.

Grupo ASSOCIAÇÃO (AS): Composto de animais que receberam, diariamente, 1 mL/100g de emulsão hiperlipídica via i.g. durante todo o experimento (fase de iniciação/promoção). Na 6ª semana receberam aplicação i.p. de DEN (20mg/100g p.c.). Na 8ª semana, esses animais receberam 4 doses de 2-AAF (1,5 mg/100g p.c.) via i.g. Depois da quarta dose de 2-AAF, foram submetidos à HP 70 % e a mais uma dose de 2-AFF de 1 mg / 100g p.c. via i.g. no 4º dia pós HP. e eutanasiados na 13ª semana.

Grupo AS + BI: Composto de animais que receberam, diariamente, 1 mL / 100 g de emulsão hiperlipídica adicionada de BI (95%; Sigma, EUA; 16mg/100g p.c.), via i.g. durante todo o experimento (fase de iniciação/promoção). Na 6ª semana receberam aplicação i.p. de DEN (20mg/100g p.c.). Na 8ª semana, esses animais receberam 4 doses de 2-AAF (1,5 mg/100g p.c.) via i.g. Depois da quarta dose de 2-AAF, foram submetidos à HP 70 % e a mais uma dose de 2-AFF de 1 mg/100g p.c. via i.g. no 4º dia pós HP e eutanasiados na 13ª semana.

Figura 1: Delineamento experimental.

3.5. Eutanásia dos Animais e coleta das amostras

Foram realizados dois pontos de eutanásia: no primeiro, com 6 semanas de experimento, 5 animais dos grupos NT, AS e AS+BI foram retirados, anteriormente a introdução do modelo RH, para verificar a presença de NAFLD. O segundo ponto foi realizado após 13 semanas de experimento. Em ambos, os animais foram anestesiados com éter etílico em câmara saturada e a eutanásia se deu por meio da coleta de sangue pela aorta abdominal e consequente choque hipovolêmico. Após, as amostras foram centrifugadas para obtenção do plasma e o mesmo foi congelado a -80°C.

A seguir, o fígado foi retirado, lavado em solução salina gelada a 0,9% e pesado em balança eletrônica digital, seguindo-se, então, o exame macroscópico do mesmo. Por fim, foram coletados fragmentos hepáticos fixados em formalina tamponada a 10% por 24 h e seguidos para processamento histológico ou congelados em nitrogênio líquido e conservados a -80°C para utilização em técnicas de biologia molecular. Após o processamento histológico (material fixado), cortes de 5 µm de espessura foram obtidos

e utilizados para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e para marcação imunoistoquímica.

3.6. Determinação da presença e do grau de NAFLD

As análises histológicas foram realizadas em cortes hepáticos corados por H&E. Para as análises dos efeitos dos tratamentos na arquitetura hepática utilizou-se o sistema de escores de Kleiner adaptado para roedores e que avalia a gravidade da NAFLD (Bruce et al., 2009). Esta avaliação foi realizada pelo Professor Dr. Luis Fernando Barbisan do Departamento de Morfologia da UNESP/Botucatu, que considerou os escores individuais: grau de esteatose (5%- 0; 5%-33% - 1; 33%-66% - 2; >66% - 3 de comprometimento), hepatócitos balonizados (nenhum -0; poucos - 1; proeminentes - 2) e inflamação lobular (nenhum - 0; 2 focos - 1; 2-4 focos - 2; > 4 focos - 3) de cada animal. O valor do escore de Kleiner foi determinado pela somatória destes escores individuais (esteatose + hepatócitos balonizados + focos de inflamação). Quando o escore de Kleiner possuiu valores totais < 3 considerou-se NAFLD leve; 3-4, NAFLD moderada e > 5 NASH.

3.7. Teste de tolerância à glicose (GTT)

Os testes de tolerância à glicose (GTT) foram realizados nos animais com o intuito de avaliar tolerância à glicose utilizando protocolo adaptado de Rafacho et al, (2007). Os animais foram mantidos em jejum durante 8 horas. Após este período foi injetada uma solução estéril de solução de glicose a 66% (2g/kg do peso corpóreo do animal), via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas, com a amputação de 1 mm da cauda, nos respectivos tempos: 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da solução de glicose, para mensurar os níveis de glicose por glicosímetro Accu-check (Roche).

3.8. Determinação do Perfil Lipídico

As concentrações de colesterol plasmático total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triacilgliceróis foram realizadas em um analisador bioquímico (Labmax 240), utilizando kits disponíveis comercialmente (Labtest). A fração VLDL foi calculada utilizando-se a equação $LDL-c = CTc - (VLDLc + HDLc)$ e $VLDLc = Triacilglicerol/5$ (Friedewald *et al.*, 1972).

3.9. Determinação de malondialdeído (MDA) no fígado

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

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

com fase móvel constituída de 60% tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7.0 e 40 % metanol.

Foi preparada uma curva de calibração utilizando malondialdeído (MDA) (Fluka 63287) nas concentrações 0,5 a 15,0 μmol . A partir da equação da reta gerada por essa curva, foi realizado o cálculo da concentração de MDA nas amostras de homogenato. A cada corrida feita no CLAE foi preparado o branco com água milli-Q e um controle externo constituído pelo MDA (Fluka 63287), na concentração de 5 μmol . Está determinação foi realizada no laboratório de desenvolvimento de alimentos funcionais.

3.10. Quantificação de βI no fígado

O conteúdo de β -ionona nos tecidos foi determinado pelo professor Eduardo Purgatto, de acordo com Su et al. (2004) com adaptações. As amostras hepáticas provenientes de 5 animais de cada grupo foram homogeneizadas em um aparelho do tipo Potter com 200 μL de etanol mais 10 ng de metil β -ionona (padrão interno – PI). Os homogenatos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000 g (4°C). Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para vials de injeção, dos quais 3 μL foram injetados um sistema de cromatografia à gás (modelo HP6890) acoplado a um detector seletivo de massas (modelo HP5973). A coluna empregada foi uma SupelcoWax 10 (30 mts x 0.25 mm diam. interno, 0.25 mm de espessura de filme). A injeção foi feita sem divisão de amostra (*Splitless*) com temperatura de 200°C . O gás de arraste utilizado foi hélio a um fluxo constante de 1ml / min. A temperatura do forno foi inicialmente mantida a 50°C por 3 minutos e aumentada até 250°C a $20^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. O monitoramento do efluente da coluna foi feito em um detector do tipo quadrupolo usando uma fonte de ionização do tipo impacto de elétrons a 70 eV com temperatura de 230°C . Os íons monitorados foram 177 e 206 para a β -ionona e 135 e 191 para o PI. Uma curva de calibração foi montada injetando de 0,1 a 10 ng de β -ionona, em vials contendo 10 ng de PI, cada. A relação de áreas β -ionona/PI foi montada utilizando o cromatograma extraído para o íon 177. Os cálculos do conteúdo de β -ionona foram baseados na mesma relação.

3.11. Exame Macroscópico dos fígados

O fígado de cada animal foi examinado individualmente quanto à presença, em sua superfície, de formações nodulares de tamanhos variados e coloração em geral esbranquiçada ou amarelada, que se distinguiram do parênquima hepático. Após o exame da superfície, cada lobo foi seccionado em fatias de aproximadamente 0,3 cm de espessura, sendo então, identificadas e contadas as lesões nodulares internas (Moreno *et al.*, 1991).

3.12. Marcação imunoistoquímica para GST-P e KI-67.

O método utilizado para a realização da marcação imunoistoquímica para anti-GST-P (1:1000; MBL, Japão) e anti-KI67 (1:50; Abcam, Inglaterra) foi o da avidina-biotina (HSU; RAINE; FANGER, 1981), empregando-se, para tanto, anticorpos primários específicos. O sistema de revelação foi constituído de anticorpo secundário biotinilado universal juntamente com complexo de streptavidina ligado a peroxidase (Dako, Dinamarca) seguida da aplicação de diaminobenzidina (DAB). A especificidade das marcações foi controlada subtraindo-se o anticorpo primário e substituindo-o por albumina sérica bovina (1% em PBS).

3.12.1. Procedimento para identificação e quantificação de LPN GST-P positivas

O número (n/cm^2), tamanho médio (mm^2) e a porcentagem de área ocupada por LPNs GST-P positivas, pLPN (coloração homogênea e bordas regulares) ou rLPN (coloração heterogênea e bordas irregulares) (Rizzi *et al.*, 1997, Silveira *et al.* 2001, Scolastici *et al.*, 2014), bem como a área total dos fragmentos hepáticos foram determinados utilizando-se o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

3.12.2. Quantificação da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pela contagem de núcleos marcados para KI-67 no surrounding, em pLPN e em rLPN, varrendo-se 10 campos por lâmina (cerca de 1000 a 2000 hepatócitos) e o resultado foi expresso em porcentagem (índice de proliferação celular).

3.13. Quantificação de células ovais

A proliferação de células ovais foi avaliada de forma semi-quantitativa, em tecidos hepáticos corados com hematoxilina & eosina (H&E), na forma de escores: ausência (0), poucas células (1), moderada (2), intermediária (3) e intensa (4).

3.14. Quantificação da apoptose

Os hepatócitos em apoptose e corpos apoptóticos foram quantificados pelo método de H&E (LEVIN et al, 1999) utilizando-se microscópio (Axio Imager M2; Carls Zeiss; Alemanha) . O número destes em cada grupo foi contado no *surrounding*, pLPN e rLPN. A leitura foi realizada varrendo-se 10 campos por lâmina (cerca de 1000 a 2000 hepatócitos) e o resultado foi expresso em porcentagem (índice apoptótico).

3.15. Avaliação de danos no DNA hepático

A avaliação de danos hepáticos foi realizada em amostras previamente armazenadas em - 80° C, utilizando-se o método de “cometa alcalino”. Entre as várias versões do ensaio do cometa, o alcalino permite a detecção do espectro mais amplo de danos no DNA podendo detectar quebras de fita dupla e simples (Hartmann et al, 2003). As amostras de fígado de ratos foram pesadas e homogeneizadas com 1,5 mL de solução de PBS (KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, 4M NaCl 137 mM, pH8,0) sob refrigeração. Então uma alíquota de 100 µL da suspensão de células foi transferida para um tubo de microcentrífuga contendo agarose de baixo ponto de fusão a

0,8% em PBS (Sigma,EUA). Em seguida, 100 µL desta suspensão de células em solução de agarose foi transferida para uma lâmina de microscopia preparada com agarose a 0,5% as quais foram submetidas ao resfriamento em 4°C. As células imobilizadas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCL, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X, 10% de DMSO, pH 10) por 2 h no escuro. As lâminas foram lavadas com água gelada livre de íons e, em seguida, mantidas em repouso na cuba de eletroforese horizontal contendo tampão (300mM NaOH, 1 mM EDTA), sob refrigeração e no escuro, por 20 minutos para desdobramento das fitas do DNA. A eletroforese foi realizada sob as seguintes condições: 0,9V/cm (voltagem aplicada /distância entre os eletrodos) por 20 min. As lâminas foram então neutralizadas em solução de 0,4M TRIS por 5 minutos e lavadas com água livre de íons. Uma vez secas, as lâminas foram mergulhadas em solução fixadora [15% de TCA (ácido tricloroacético), 5% de ZnSO₄, 5% de glicerina, e água ultra pura] por 10 minutos, novamente lavadas em água livre de íons e secas à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram coradas com nitrato de prata conforme Nadin et al (2001). A coloração consistiu na mistura de solução com prata (0,05% de nitrato de amônio, 0,05% nitrato de prata, 0,125% ácido túngstico , 0,075% formaldeído) com outra de 5% Na₂CO₃ por, pelo menos 10 min ao abrigo da luz (GARCIA et al., 2007). A reação de coloração foi interrompida com solução de ácido acético 0,1%. O comprimento do “cometa” foi avaliado utilizando-se microscópio sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha). Imagens que apresentavam aspecto de “nuvem” ou que não fosse possível identificar a separação da cabeça com a cauda, ou ainda, que apresentavam cabeça muito pequena e cauda no formato de balão (possivelmente células necróticas ou apoptóticas) não foram consideradas como cometas (Barbisan et al., 2003). Os resultados foram expressos em comprimento de cometa uma vez que há uma relação direta entre o comprimento do cometa e o dano no DNA (Mccarthy et al, 1997).

3.16 Avaliação da expressão gênica de *Thy 1*, *Insig 1* e *Hmgcr* por RT - qPCR.

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR

Experiment (BUSTIN et al., 2009). A extração do RNA foi realizada com o kit Illustra RNAspin (GE, EUA) segundo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNase (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Scientific, EUA). A transcrição reversa dos mRNAs obtidos do fígado foi realizada utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

Cada amostra de cDNA foi analisada com ensaios TaqMan (Life Technologies, EUA), contendo primers e sondas de hidrólise específicos para *Thy 1* (Applied Biosystems Rn00562048_m1), *Insig 1* (Applied Biosystems Rn000574380_m1), e *Hmgcr* (Applied Biosystems Rn00565598_m1) e *Gapdh* (controle endógeno, Applied Biosystems 4352338E). Para cada reação foram utilizados 10 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X) (Life Technologies, EUA), 4 µL do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 20 µL com água livre de nucleases.

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

3.17. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (teste de Brown-Forsythe). Quando atendidos esses requisitos, as comparações foram realizadas com o teste paramétrico de Análise de Variância Unidimensional (One-Way-ANOVA) seguida do teste de Duncan. Quando não foi observada distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das

variâncias, adotou-se teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de teste Dunn. Para a análise macroscópica foi utilizado o teste exato de Fischer. Em todos os casos foi adotado o nível de significância de 5%. O software utilizado foi o STATISTICA 8.0).

4.RESULTADOS

4.1. Determinação da presença de NAFLD

Após 6 semanas de administração de emulsão hiperlipídica ocorreu o primeiro ponto de eutanásia, no qual foi verificado a presença de NAFLD, anteriormente à introdução do modelo do RH (DEN + 2-AFF + HP). Assim, 5 animais dos grupos NT, AS e AS+BI foram eutanasiados e avaliados em relação ao peso corpóreo, consumo de ração, peso hepático, determinação do grau de esteatose, focos de inflamação e número de hepatócitos balonizados e GTT.

4.1.1. Evolução do peso corpóreo e do consumo de ração dos animais submetidos a 6 semanas de emulsão hiperlipídica

Observou-se que a partir da 2ª semana de experimento os animais do grupo AS apresentaram menor ($p<0,05$) ganho de peso em relação ao grupo NT e maior ($p<0,05$) ganho de peso em relação ao grupo AS + BI (**Tabela 2**).

Tabela 2: Evolução do peso corpóreo dos animais dos grupos não tratado (NT) ou submetidos por 6 semanas à emulsão hiperlipídica (AS) e tratados com BI (AS+ BI).

Grupos (n)	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
NT (5)	156,42±7,02	200,71±12,96	242,42±6,42	279,71±5,09	303,57±4,94	323,5±2,69
AS (5)	157±5,38	188,64±9,21	221,64±4,07a	249,14±3,49a	269,28±2,81a	283,85±3,11a
AS + BI (5)	152,37±6,34	171,1±7,88 b	204,17±5,19 b	229±3,85b	252,42±2,92b	272,57±2,2b

Dados expressos como média ± EPM; a – diferente de NT, b- diferente de AS ($p<0,05$), ANOVA seguido de teste de Duncan, n= 5.

O consumo de ração do grupo NT foi cerca de 30% maior em relação ao grupo AS e AS+BI. O consumo de ração ao final da 6ª semana foi menor ($p<0,05$) no grupo

AS ($5,80 \pm 0,18$) e AS+BI ($6,01 \pm 0,11$) em relação ao grupo NT ($9,79 \pm 0,23$). Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) em relação ao consumo de ração entre os grupos AS e AS+BI (**Figura 2**).

Figura 2: Evolução do consumo de ração (g)/100g p.c. dos animais dos grupos não tratado (NT) ou submetidos por 6 semanas à emulsão hiperlipídica (AS) e tratados com BI (AS+BI); n=5. Dados expressos como média e desvio padrão a – diferente de NT.

4.1.2. Peso corpóreo inicial e final, hepático absoluto e relativo dos animais submetidos a 6 semanas de emulsão hiperlipídica

Foram avaliados os pesos corpóreos iniciais e finais, hepáticos absolutos e relativos dos animais. Não foi encontrada diferença significativa em relação ao peso inicial dos grupos avaliados, entretanto em relação ao peso final os animais do grupo AS apresentaram menor valor ($p < 0,05$) em relação ao grupo NT (**Tabela 3**). Não se observou diferença estatística ($p \geq 0,05$) em relação ao peso corpóreo final entre os grupos AS+BI e AS. Os animais do grupo AS apresentaram ainda maior valor ($p < 0,05$) de peso hepático absoluto e relativo em comparação aos animais do grupo NT e menor

($p < 0,05$) valor de peso hepático relativo em comparação ao grupo AS+BI. Não houve diferença ($p \geq 0,05$) em relação ao peso hepático absoluto entre os grupos AS+BI e AS. Observou-se ainda que o fígado do grupo AS apresentou-se com coloração amarelada típica da presença de gordura no órgão (**Anexo 1A-1C**).

Tabela 3: Pesos corpóreos iniciais e finais e hepáticos absoluto e relativo dos animais dos grupos não tratado (NT) ou submetidos por 6 semanas à emulsão hiperlipídica (AS) e tratados com BI (AS + BI) .

Grupo (n)	Peso corpóreo inicial (g)	Peso corpóreo final (g)	Peso hepático absoluto (g)	Peso hepático relativo (g)
NT (5)	145,4±5,43	325,4±6,07	9,73±0,18	2,99±0,05
AS (5)	145,6±1,88	302,2±5,72 ^a	12,71±0,54 ^a	4,21±0,14 ^a
AS+BI (5)	140,6±2,05	287,2±3,85	13,11±0,47	4,56±0,13 ^b

Dados expressos como média ± EPM; a – diferente de NT, ($p < 0,05$), ANOVA seguido de teste de Duncan, n= 5.

4.1.3. Análise histológica do fígado dos animais submetidos a 6 semanas de emulsão hiperlipídica.

Foi analisada a presença de NAFLD no fígado dos animais eutanasiados em 6 semanas por meio da avaliação do grau de esteatose, de inflamação e presença de hepatócitos balonizados (**Anexo 1G-I**) que resultaram no escore de Kleiner (Bruce et al., 2009). É possível observar que o grupo AS+BI apresentou menor ($p < 0,05$) grau de esteatose e focos de inflamação comparado ao grupo AS. O grupo AS+BI apresentou ainda menor valor de hepatócitos balonizados, embora sem diferença do ponto de vista estatística ($p \geq 0,05$).

Figura 3: Grau de esteatose (A), número de hepatócitos balonizados (B), número de focos de inflamação (C) analisados em H&E em ratos Wistar submetidos por 6 semanas à emulsão hiperlipídica (AS) e tratados com BI (AS + BI). Dados expressos como média $\pm$ EPM, a- diferente de AS ($p < 0,05$) ANOVA seguido de teste de Duncan ($n=5$).

Segundo Kleiner et al (Kleiner et al., 2005) valores relativos ao escore total inferiores a 3 são classificados como NAFLD leve, de 3 a 4 moderadas e superiores a 5 como NASH. De acordo com o escore de Kleiner o grupo AS apresentou escore maior que 5,8 apresentando, portanto, NASH. Entretanto, o grupo AS+ BI obteve escore de 3,4 sendo classificado com NAFLD moderada.

4.1.4. Teste de tolerância à glicose dos animais submetidos a 6 semanas de emulsão hiperlipídica.

Os animais dos grupos NT, AS e AS + BI foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT). Observou-se que o grupo AS apresentou maior ($p < 0,05$) valor de glicemia basal (T0) em relação ao grupo NT e AS + BI. (Figura 4). Nos demais tempos analisados (15, 30, 60, 90 e 120 minutos) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$).

Figura 4 :Teste de Tolerância a Glicose (GTT) em ratos *Wistar* não tratados (NT) ou submetidos por 6 semanas à emulsão hiperlipídica (AS) e tratados com BI (AS+BI). n=5. Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de NT b- diferente de AS ($p < 0,05$) ANOVA seguida de teste de Duncan.

4.2. Associação de NAFLD e modelo do RH

Como após 6 semanas os animais apresentaram NAFLD, o modelo do RH foi introduzido para verificar se sua associação com a esteatose potencializaria o desenvolvimento de LPN. Assim ao término de 13 semanas os animais dos grupos RH, AS e AS +BI foram eutanasiados e avaliados quanto ao peso corpóreo, consumo de ração, peso hepático, grau de esteatose, de inflamação, número de hepatócitos balonizados, GTT, perfil de lipídico, MDA, quantificação hepática de BI, macroscopia, GST-P, proliferação celular (KI-67), presença de células ovais, apoptose, análise de dano no DNA e expressão de *Thy 1*, *Insig 1*, *Hmgcr*. Os fígados dos animais do grupo NT foram utilizados somente para normalização das análises de biologia molecular.

4.2.1. Evolução do peso corpóreo e do consumo de ração dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

Observou-se que após a administração de DEN (20 mg/100 g de peso corpóreo [p.c.]) na 6ª semana, houve perda de peso nos animais dos grupos RH, AS e AS +BI. De forma similar, a administração de 2-AAF e a HP a 70% também contribuíram para a perda de peso dos grupos RH, AS e AS+BI na 8ª e 9ª semanas, assim como descrito previamente para o modelo do RH (Kuroiwa-Trzmielina, 2007)(**Figura 5**).

Figura 5: Evolução de peso corpóreo dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). DEN = dietilnitrosamina; 2-AAF = 2-acetilaminofluoreno; HP = hepatectomia parcial a 70%.

Em relação ao consumo de ração, observou-se que após a administração de DEN houve diminuição do consumo nos grupos RH, AS e AS+BI. A administração de 2-AAF e a HP a 70% também contribuíram para a redução do consumo de ração nos grupos RH, AS e AS+BI na 8ª e 9ª semanas (**Figura 6**). Não foi observada diferença estatística ($p \geq 0,05$) do consumo de ração ao final da 13ª semana entre grupo AS

($7,3 \pm 0,22$) em relação ao grupo RH ($6,5 \pm 0,18$), assim como entre o grupo AS e AS+BI ($6,3 \pm 0,21$).

Figura 6: Evolução do consumo de ração dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). DEN = dietilnitrosamina; 2AAF = 2-acetilaminofluoreno; HP = hepatectomia parcial a 70%.

4.2.2. Pesos corpóreos inicial e final, hepático absoluto e o relativo dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

Não se observou diferença estatística ($p \geq 0,05$) nos valores de peso inicial e final entre os grupos. Entretanto o peso hepático absoluto dos animais do grupo AS foi maior ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo RH e menor ($p < 0,05$) quando comparado com ao grupo AS + BI. O peso relativo do fígado dos animais do grupo AS também foi maior ($p < 0,05$) em relação ao grupo RH e menor ($p < 0,05$) em relação ao grupo AS + BI (Tabela 4).

Tabela 4: Pesos corpóreos iniciais e finais, hepático absoluto e relativo dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8).

Grupo (n)	Peso corpóreo inicial (g)	Peso corpóreo final (g)	Peso hepático absoluto (g)	Peso relativo do fígado (g)
RH (7)	143 ±1,85	384 ± 2,67	9,79 ± 0,25	2,56 ± 0,05
AS (7)	144±1,22	369 ± 7,98	12,41 ± 0,46 ^a	3,31 ± 0,09 ^a
AS +BI (8)	144±0,79	399 ± 12,39	17,11 ± 0,60 ^b	4,33 ± 0,06 ^b

Dados expressos como média ± EPM; a – RH e b- diferente de AS (p<0,05), ANOVA seguida de teste de Duncan.

Observou-se que os fígados dos grupos AS e AS+BI (**Anexo 1D-1F**) apresentaram coloração amarelada típica da presença de gordura, sendo que no grupo AS, a coloração apresenta-se mais proeminente.

4.2.3. Análise histológica do fígado dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

Assim como realizado em 6 semanas, foi analisada a presença de NAFLD no fígado dos animais de 13 semanas também por meio da avaliação do grau de esteatose presença de hepatócitos balonizados e focos de inflamação (**Figura 7**) e calculado o escore de Kleiner. É possível observar que o grupo AS+BI apresentou menores (p<0,05) valores de grau de esteatose e de focos de inflamação em comparação ao grupo AS. Não houve diferença estatística (p≥0,05) em relação aos hepatócitos balonizados entre os grupos.

Figura 7: Grau de esteatose (A), número de hepatócitos balonizados (B), número de focos de inflamação (C) analisados em H&E em ratos *Wistar* submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de AS ($p < 0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.

4.2.4. Teste de tolerância à glicose dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

Após 13 semanas 5 animais dos grupos RH, AS e AS + BI, foram submetidos ao teste GTT. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre os grupos em nenhum dos pontos analisados (0, 15, 30, 60, 90, 120 minutos) (**Figura 8**). Entretanto é possível observar que o grupo AS apresentou maiores níveis séricos de glicemia nos tempos de 15 e 30 minutos cerca de 20% a mais que o grupo AS+ BI.

Figura 8: Teste de Tolerância a Glicose (GTT) dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8).n=5.

4.2.5 Níveis séricos de triglicerídeos, colesterol, HDL, LDL e VLDL dos animais submetidos a 13 semanas de experimento.

Observou-se que o grupo AS apresentou maiores ($p < 0,05$) níveis de colesterol e LDL em relação ao grupo RH. Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) para estes parâmetros entre os grupos AS+BI e AS. Em relação aos níveis de HDL observou-se que o grupo AS apresentou menores valores ($p < 0,05$) em comparação aos grupos RH e AS+BI. Em relação aos TG e VLDL, não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os grupos (**Tabela 5**).

Tabela 5: Média dos parâmetros de perfil lipídico TG (Triacilgliceróis), colesterol, HDL, LDL e VLDL séricos dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8).

Grupos	TG	Colesterol	HDL	LDL	VLDL
RH	28,00±2,51	67±2,28	27±0,71	8±0,48	6,35±0,47
AS	48,15±5,70	197,5±13,75 ^a	17±1,02 ^a	69±4,26 ^a	9,13±1,01
AS+ BI	51,21±5,77	210±9,95	24±1,09 ^b	69±4,01	11,842±1,15

Dados expressos como média ± EMP a – diferente de RH, b- diferente de AS (p<0,05), ANOVA seguido de teste de Duncan.

4.2.6 Níveis hepáticos de MDA dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

Os níveis hepáticos de MDA apresentaram-se maiores (p<0,05) no grupo AS em relação ao grupo RH (**Figura 9**). É possível observar ainda que o grupo AS+ BI apresentou menor valor em relação ao AS, embora sem que se tenha alcançado diferença estatisticamente significativa (p≥0,05).

Figura 9: Concentrações hepáticas de MDA/100µg de proteína dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). Dados expressos como média ± EPM a - diferente de RH ($p<0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.

4.2.7 Níveis hepáticos de BI nos animais submetidos a 13 semanas de experimento

A concentração hepática de BI no grupo AS + BI apresentou-se maior ($p<0,05$) quando comparada ao grupo AS (**Figura 10**). Não houve diferença estatística ($p\geq 0,05$) entre os grupos AS e RH em relação à concentração hepática de BI.

Figura 10: Concentração hepática de beta ionona (BI) dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 5), a associação (AS n= 5) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n= 5). Dados expressos como média ± EPM a - diferente de AS ($p<0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.

4.2.8 Macroscopia dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

Observou-se maior incidência, número total e multiplicidade de nódulos no grupo AS em relação aos grupos RH e AS + BI, embora sem diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$). Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) em relação à porcentagem de nódulos menor ou maior que 1 mm entre os grupos. (Tabela 6).

Tabela 6: Incidência, número total, multiplicidade e tamanho de nódulos visíveis em dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n= 8).

Grupos	Incidência (%)	No. total de nódulos	Multiplicidade	Porcentagem <1mm	Porcentagem >1mm
RH (7)	57,1	16	4	93,75	6,25
AS (7)	85,7	46	7,67	95,65	4,35
AS + BI (8)	50,0	13	3,25	92,31	7,69

4.2.9. Morfometria dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

Observou-se maior ($p < 0,05$) n°/cm^2 e tamanho médio de pLPN no grupo AS em comparação ao grupo RH (Anexo 2 A-B). O grupo AS+BI apresentou menor ($p < 0,05$) n°/cm^2 e tamanho médio de pLPN em comparação ao grupo AS. Em relação ao n°/cm^2 e tamanho médio de rLPN não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre os grupos. Não houve diferença ($p \geq 0,05$) no % de área hepática tanto de pLPN e rLPN entre os grupos AS e RH. Entretanto, o grupo AS+BI apresentou menor ($p < 0,05$) % de área hepática das

pLPN em comparação ao grupo AS. O % de área hepática de rLPN não foi diferente ($p \geq 0,05$) esses grupos (**Tabela 7**).

Tabela 7: Análise morfométrica pela marcação com GST-P, demonstrando número de LPN por cm^2 , tamanho médio das LPN (mm^2) e porcentagem de área hepática ocupada pelas mesmas de animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8).

Marcações GST-P positivas						
Grupos (n)	nº/ cm^2		Tamanho médio (mm^2)		% área hepática	
	pLPN	rLPN	pLPN	rLPN	pLPN	rLPN
RH (7)	11,29±1,48	21,04±4,15	0,15±0,04	0,13±0,04	1,72±0,40	3,34±1,65
AS (7)	23,99±3,75 ^a	33,29±5,82	0,12±0,13 ^a	0,09±0,02	3,09±0,01	3,51±0,94
AS+BI (8)	8,35±2,52 ^b	23,78±6,33	0,07±0,07 ^b	0,10±0,03	0,70±0,29 ^b	1,97± 0,66

Dados expressos como média $\pm$ EPM a -diferente de RH, b-diferente de AS ($p < 0,05$), ANOVA seguida de teste Duncan.

4.2.10 Proliferação celular no fígado dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

Houve aumento da proliferação celular nas pLPN do grupo AS (**Anexo 2D**) em relação ao grupo RH (**Anexo 2C**) ($p < 0,05$) e diminuição no grupo AS+ BI (**Anexo 2E**) em comparação ao grupo AS ($p < 0,05$) (**Figura 11**). Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) na proliferação celular no *surrounding* e nas rLPN entre grupos.

Figura 11: Quantificação do índice de proliferação celular marcado com KI67 do fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8).n=8). Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de RH, b - diferente de AS ($p < 0,05$), ANOVA seguida de teste de Duncan.

4.2.11 Células ovais dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

O grupo AS+BI apresentou menor ($p < 0,05$) escore de células ovais em comparação ao grupo AS. Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os grupos AS e RH em relação a este parâmetro (**Figura 12 e Anexo 2F**).

Figura 12: Escore de células ovais dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de AS ($p < 0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.

4.2.12 Apoptose no fígado dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

Observou-se maior ($p < 0,05$) índice apoptótico em pLPN do grupo AS quando comparado ao grupo RH, porém sem diferença ($p \geq 0,05$) entre os grupos AS+BI e AS (**Figura 13 e Anexo 2G**). Não foi observada diferença do ponto de vista estatístico ($\geq 0,05$) do índice apoptótico no *surrounding* e nas rLPN entre os grupos.

Figura 13: Quantificação do índice apoptótico do fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de RH, ANOVA seguido de teste Duncan.

4.2.13 Dano no DNA no fígado dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) quanto ao comprimento do cometa entre os grupos, embora o grupo AS apresentou maior valor em comparação aos demais grupos (**Figura 14 e Anexo 2H**).

Figura 14: Comprimento (μm) dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH $n=7$), a associação (AS $n=7$) e a associação e tratamento com BI (AS + BI $n=8$). Dados expressos como média $\pm$ EPM.

4.2.14 Expressão gênica de *Thy 1*, *Insig 1*, e *Hmgcr* dos animais submetidos a 13 semanas de experimento

Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) na expressão de *Thy* e *Insig 1* entre os grupos, embora o grupo AS+BI apresentou menor expressão de *Thy 1* e *Insig 1*, cerca de 40%, quando comparado com o grupo AS. O gene *Hmgcr* apresentou-se com expressão reduzida ($p < 0,05$) no grupo AS em comparação ao grupo RH, porém não houve diferença ($p \geq 0,05$) na expressão desse gene entre os grupos AS+BI e AS (**Figura 15**).

Figura 15: Expressão gênica relativa ao grupo NT (valor fixado em 1) de *Thy 1*, *Insig 1*, e *Hmgcr* dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n= 7), a associação (AS n= 7) e a associação e tratamento com BI (AS + BI n=8). a- diferente de RH, b- diferente de AS + BI ($p < 0,05$), ANOVA seguida de teste de Duncan.

5. Discussão

A NAFLD é reconhecida como a manifestação hepática da síndrome metabólica e, frequentemente, coexiste com a obesidade, dislipidemia e resistência à insulina (Loomba & Sanyal, 2013). Embora em indivíduos com obesidade o risco de desenvolvimento da NAFLD esteja aumentado (Dowman *et al.*, 2011; Leung *et al.*, 2015), a presença da doença é também observada em indivíduos eutróficos (Loomba & Sanyal, 2013). A incidência de NAFLD aumentou significativamente no mundo tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (Loomba & Sanyal, 2013; Bettermann, Hohensee & Haybaeck, 2014), sendo recentemente considerada um

dos principais fatores relacionados a doenças hepáticas crônicas (Wree et al, 2013; Gerhard & DiStefano, 2015).

O acúmulo hepático de lipídios é a principal característica da presença da NAFLD (Michelotti et al, 2013). Entretanto o desenvolvimento desta afecção envolve também outros fatores metabólicos (resistência à insulina, estresse oxidativo e inflamação), desregulações genéticas e de microbiota intestinal (Wree et al, 2013). Devido a esta complexidade, a patogênese da NAFLD é ainda pouco compreendida (Naik, Košir & Rozman, 2013). Dessa forma, os modelos de NAFLD em animais são fundamentais para elucidar os mecanismos de patogênese e avaliar possíveis agentes preventivos e terapêuticos (Takahashi et al, 2012). Estes devem ser reprodutíveis, confiáveis, simples, acessíveis e tecnicamente disponíveis com desvantagens mínimas (Kucera & Cervinkova, 2014).

Para o estudo da NAFLD existem modelos que atuam na redução da exportação e do catabolismo hepático de lipídios, como dietas com deficiência em colina e/ou metionina, e modelos que aumentam a produção e importação hepática de lipídios, como dietas hipercalóricas e hiperlipídicas (Hebbard & George, 2011).

As rações deficientes em colina e/ou metionina são capazes de desenvolver NAFLD induzindo esteatose hepática grave, necro-inflamação e fibrose (Hebbard & George, 2011). Entretanto, a principal desvantagem da utilização destes modelos é que o perfil metabólico é oposto ao observado em humanos, ou seja, reduzidos níveis de glicose jejum, insulina e leptina, sensibilidade periférica à insulina e adiponectinas em níveis basais (Takahashi et al, 2012), sendo, portanto, pouco representativos da NAFLD. As rações hiperlipídicas e hipercalóricas também são utilizadas para induzir o desenvolvimento de NAFLD (Nakamura & Terauchi, 2013). Nestes modelos, os animais apresentam esteatose e inflamação hepática, estresse oxidativo e fibrose, além de simular os parâmetros metabólicos encontrados em humanos (Hebbard & George, 2011). Entretanto estes modelos apresentam variáveis resultados em termos de grau de esteatose, inflamação e fibrose, pois os resultados dependem da composição da ração, do tipo de gordura utilizada e no tempo de tratamento (Takahashi et al, 2012).

A administração i.g de emulsão hiperlipídica desenvolvido por Zou e colaboradores (2006) durante seis semanas também têm sido utilizada como modelo para indução de NAFLD (Hebbard & George, 2011 ; Li et al, 2011). Este modelo resulta no aumento sérico de colesterol total, triacilgliceróis e TNF- α , hiperinsulinemia,

hiperglicemia e resistência à insulina, lesões mitocondriais e inflamação hepática em ratos Sprague-Dawley, sendo, portanto, um modelo relevante para o estudo da NAFLD. Além disso, a administração via i.g. possibilita o controle preciso da ingestão de lipídios da ração.

De acordo com a literatura há uma relação entre NAFLD e risco aumentado do desenvolvimento de HCC (Michelotti et al, 2013); entretanto, são poucos os estudos que analisam esta interação em fases precoces da hepatocarcinogênese (Wang, 2009). No presente estudo, avaliou-se o efeito da associação entre a NAFLD e o modelo do RH no desenvolvimento de LPN nas etapas de iniciação/promoção da hepatocarcinogênese. Além de verificar se a NAFLD potencializou o modelo do RH, analisou-se a atividade quimiopreventiva da BI nesta associação, visto que estudos anteriores do grupo revelaram que este isoprenoide apresenta potencial quimiopreventivo no modelo do RH (De Moura Espindola et al., 2005, Cardozo et al., 2011, Scolastici et al., 2014).

Com o intuito de se verificar a presença de NAFLD, ratos *Wistar* foram eutanasiados após seis semanas de administração de emulsão hiperlipídica. Observou-se que seis semanas foram suficientes para o desenvolvimento de NAFLD pela análise do escore de Kleiner (grau de esteatose, número de hepatócitos balonizados e número de focos de inflamação). Além disso, a adição de BI nesta emulsão atenuou o desenvolvimento da NAFLD. O mesmo ocorreu após a associação da emulsão ao modelo do RH nos ratos tratados com BI por 13 semanas. A quantificação de BI hepática demonstrou que este composto estava presente em seu órgão alvo, e que, portanto, que os efeitos observados no grupo AS+BI foram decorrentes da administração de BI.

Na presença de NAFLD o fígado apresenta acúmulo de diversos tipos de lipídios que causam esteatose (Michelotti et al, 2013). Dentre estes, os níveis elevados de colesterol merecem destaque uma vez que parecem estar relacionados com a resposta inflamatória no fígado (Walenbergh *et al.*, 2013). Além disso, o colesterol pode atuar em mecanismos importantes da carcinogênese como progressão do ciclo celular, diferenciação e proliferação celular (Yeganeh et al, 2014). A NAFLD está associada com aumento de níveis séricos de LDL e triacilgliceróis, acompanhado da diminuição de HDL (Tacer & Rozman et al, 2011). Em estudo anterior do grupo (De Moura Espindola *et al.*, 2005) a BI diminuiu os níveis plasmáticos de colesterol quando administrada na fase de iniciação/promoção inicial em animais submetidos somente ao

modelo do RH. Entretanto, em nosso estudo a BI não modulou os níveis séricos de colesterol, indicando que este isoprenoide não foi capaz de interferir neste parâmetro quando da associação de NAFLD e RH. Isto sugere que a divergência entre os resultados esteja relacionada à presença de esteatose hepática no modelo de associação de NAFLD com RH. Em relação aos níveis glicêmicos e aos demais parâmetros avaliados do perfil lipídico, não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a ação da BI neste contexto. No presente estudo, a BI não reduziu os níveis séricos de TG, LDL, VLDL e glicemia, porém aumentou os níveis de HDL.

A presença de elevados níveis de ácidos graxos livres pode desencadear estresse de retículo endoplasmático além de disfunção mitocondrial, que, subsequentemente, leva ao aumento da produção de radicais livres (Milonski et al, 2015). Estas moléculas estão relacionadas ao aumento da peroxidação lipídica e dano no DNA, que resultam em acúmulo de mutações, instabilidade genética e transformação maligna (Liu et al, 2010). No estudo de Asokkumar et al, (2012), a BI reduziu, no pulmão e no soro, a peroxidação lipídica medida pelos níveis de MDA / proteína em camundongos induzidos ao câncer de pulmão com benzo(a)pireno. Entretanto, no presente estudo não foi observada uma ação da BI nos níveis de MDA hepáticos, talvez devido ao excesso de ácidos graxos fornecidos pela emulsão. Deste modo, a BI parece atenuar o desenvolvimento da NAFLD por mecanismos distintos dos avaliados até o momento.

A associação da administração de emulsão hiperlipídica durante 13 semanas com o modelo do RH resultou já na macroscopia, em sugestiva potencialização do modelo demonstrada pelo aumento marginal na incidência, número total e na multiplicidade de nódulos hepáticos no grupo AS em relação ao grupo RH. Este efeito foi corroborado pela análise microscópica de GST-P, na qual foi observado aumento no número e na porcentagem de área ocupada por pLPN, e pelo aumento na proliferação celular em pLPN no grupo AS em relação ao RH, demonstrando que a emulsão potencializou o modelo do RH. De maneira semelhante, no estudo de Wang et al, (2009) ratos Sprague-Dawley submetidos a uma única dose de DEN (30 mg DEN/kg p.c.) e tratados com dieta líquida hiperlipídica (71% de energia proveniente de gordura) durante seis semanas apresentaram maior incidência de LPN.

A BI tem potencial quimiopreventivo em diversas células de câncer como de mama, colón, gástrico, melanoma e leucemia (Liu et al, 2010). Além disso, este composto é capaz de inibir o processo de carcinogênese hepática (Scolastici *et al.*,

2014) e mamária (Liu et al, 2010). No presente estudo, foi observado efeito quimiopreventivo da BI no grupo AS+BI pela diminuição no número e na porcentagem de área hepática de pLPN, assim como em nossos estudos prévios (De Moura Espindola et al., 2005, Cardozo *et al.*, 2010), mesmo na presença de NAFLD. Esta diminuição pode estar relacionada à capacidade da BI de inibir enzimas responsáveis pelo bloqueio e estimular enzimas detoxificação de carcinógenos, enzimas de fase I e II, respectivamente (De-Oliveira, Fidalgo-Neto & Paumgartten, 1999; Kuno & Mizutani et al, 2005). A diminuição das pLPN, pode ainda estar relacionada a capacidade da BI em modular proteínas chaves no processo de carcinogênese, como a p53, NF- κ B e TGF- α , que estão alterados já em fases pré-neoplásicas (Scolastici *et al.*, 2014).

Além disso, embora a BI apresente a capacidade de modular tanto a proliferação celular quanto a apoptose (Liu et al, 2004, Janakiram et al, 2010, Jones et al, 2013) “*in vitro*”, em nosso estudo “*in vivo*” não houve diferença no índice apoptótico do grupo AS+BI em relação ao grupo AS nas pLPN e rLPN, estes resultados corroboram com estudo prévio do grupo no qual a BI não modulou a apoptose em pLPN (Cardozo *et al.*, 2010). Entretanto, a proliferação celular em pLPN foi reduzida no grupo AS+BI, demonstrando seu potencial quimiopreventivo nestas lesões que comumente evoluem para o HCC (Schulte-Hermann, 1990; De Miglio et al, 2003). Relata-se que a BI suprime a proliferação por induzir a parada do ciclo celular na fase G1 de células neoplásicas de melanoma murino B16, leucemia promielocítica aguda humana HL-60, de adenocarcinoma do cólon humano Caco-2 e HCT116 (Jones et al, 2013). O ciclo celular é dirigido pela família de proteínas conhecidas como ciclinas dependentes de quinase (CDKs), a associação das CDKs com as ciclinas (A, B, D e E) forma complexos denominados Ciclina/CDK, que são ativados e promovem fosforilação de sítios específicos em CDKs, resultando no funcionamento normal do ciclo celular (Schwartz, 2002; Lopez-Mejia & Fajas, 2015). Em células neoplásicas de mama MCF-7, a BI reduziu a atividade da CDK2, e expressão de ciclinas D1 e E em células (Duncan et al, 2004). Deste modo, é possível que a BI tenha inibido a proliferação no presente trabalho por induzir o bloqueio do ciclo celular.

A BI ainda reduziu o escore de células ovais, sugerindo-se que tenha ocorrido uma inibição da proliferação das células ovais nos animais do grupo AS+BI. De maneira semelhante, Dagli et al, (1998) e Naves et al, (2001) relataram que o BC, que apresenta o anel BI em sua estrutura, atuou reduzindo o número de células ovais na

etapa de iniciação/promoção do modelo do RH. O menor número dessas células no grupo AS+BI pode ser confirmado pela análise da expressão de *Thy1*, um marcador de células ovas (Sukowati, et al 2013 ; Xu et al, 2015) que apresentou-se com expressão reduzida neste grupo, embora não tenha alcançado diferença do ponto de vista estatístico. A administração de 2-AAF seguida pela HP inibe a proliferação de hepatócitos maduros e ativa a proliferação de células ovas (Petersen, Zajac & Michalopoulos, 1998). Estas podem se diferenciar em hepatócitos maduros e células epiteliais biliares, a fim de regenerar a massa de fígado ou podem dar origem a CSCs (Xiang et al, 2012). Deste modo é possível que a BI tenha induzido o processo de diferenciação das células ovas uma vez que houve redução do escore destas células no grupo AS+BI.

Como o acúmulo hepático de gordura pode levar ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hebbard e George, 2011), a administração da emulsão hiperlipídica associada ao modelo do RH poderia potencializar os danos gerados ao DNA. Deste modo, embora não tenha alcançado diferença do ponto de vista estatístico, a BI diminuiu a intensidade de danos no DNA do fígado do grupo AS+BI em relação ao grupo AS. Assim, para confirmar este potencial da BI, será realizada a quantificação da proteína pH2AX, uma variante da histona H2A considerada marcador de danos no DNA (Turinetti & Giachino, 2015).

Houve redução da expressão de *Hmgcr* no grupo AS em relação ao RH, o que poderia ser explicado por um mecanismo de feedback negativo (Ness, 2015). Quando os níveis de colesterol estão reduzidos, a transcrição do gene para *Hmgcr* é aumentada pela ligação dos fatores de transcrição *sterol regulatory element binding proteins* (SREBPs) em seu promotor. Os SREBPs sofrem ativação proteolítica pela SCAP (*SREBP cleavage activating protein*), uma proteína de membrana com um domínio de ligação de esterol que se associa aos precursores SREBP no retículo endoplasmático (RE), sendo este complexo transportado para o Golgi, onde a SREBP sofre clivagem em fragmentos ativos que vão para o núcleo e sinalizam a transcrição de genes relacionados ao aumento do colesterol. Quando o nível de colesterol celular está elevado, SCAP se liga na proteína INSIG, o que retém SCAP e os precursores inativos SREBPs no RE, impedindo a geração do SREBPs ativos (Tsai *et al.*, 2012). Além disso, na presença de colesterol as INSIGs promovem a ubiquitinação da HMGCR, aumentando a degradação dessa enzima (Burg e Espenshade, 2011). Entretanto, em nosso estudo, a BI não

apresentou ação sob o ponto de vista estatístico na expressão dos genes *Hmgcr* e *Insig* no grupo AS+BI em relação ao grupo AS, sugerindo que essa via não seja um alvo de atuação da BI.

Assim, no contexto de esteatose hepática associada ao modelo do RH, a administração de BI durante a etapa de iniciação/promoção em ratos Wistar resultou em pronunciada atividade quimiopreventiva. Esta atividade se deu pela diminuição de pLNP, redução da proliferação celular e do número de células ovais, consideradas potenciais alvos para o desenvolvimento da hepatocarcinogênese. São necessárias outras análises de biologia molecular para determinar quais são as vias pelas quais a BI pode atuar na carcinogênese associada à esteatose hepática.

6. Conclusão

A NAFLD potencializou o desenvolvimento de LPNs em ratos submetidos ao modelo do RH na etapa de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese. Além disso, a BI apresentou atividade quimiopreventiva nesta associação (NAFLD + RH).

7. Referências

ALBERTI, K. G. M. M. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International atherosclerosis society; And international association for the study of obesity. *Circulation*, v. 120, n. 16, p. 1640-1645, 2009.

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

ASOKKUMAR, S. et al. Antiproliferative and antioxidant potential of beta-ionone against benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Mol Cell Biochem*, v. 363, n. 1-2, p. 335-45, Apr 2012.

- BAFFY, G.; BRUNT, E. M.; CALDWELL, S. H. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: An emerging menace. *Journal of Hepatology*, v. 56, n. 6, p. 1384-1391, 2012.
- BANNASCH, P.; HAERTEL, T.; SU, Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. *Toxicologic Pathology*, v. 31, n. 1, p. 134-139, 2003.
- BAO, Y. et al. Mammalian Hippo pathway: From development to cancer and beyond. *Journal of Biochemistry*, v. 149, n. 4, p. 361-379, 2011.
- BARBISAN, L. F. et al, Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Genet Mol Res.* v.2,n.3, p.295-308, 2003.
- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*, v. 21, n. 6, p. 167-223, Dec 2000.
- Bettermann, K. ; Hohensee, T. & Haybaeck, J. Steatosis and steatohepatitis: complex disorders. *Int J Mol Sci.* v.15, n.6, p.9924-9944, 2014.
- BIEGHS, V. et al. Specific immunization strategies against oxidized low-density lipoprotein: A novel way to reduce nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*, v. 56, n. 3, p. 894-903, 2012.
- BLONSKI, W.; KOTLYAR, D. S.; FORDE, K. A. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, v. 16, n. 29, p. 3603-15, Aug 7 2010. ISSN 2219-2840 (Electronic)
- BRUCE, K. D. et al. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology*, v. 50, n. 6, p. 1796-808, Dec 2009.
- BUENDIA, M & NEUVEUT, C Hepatocellular. Carcinoma *Cold Spring Harb Perspect Med.* v.5, n.2, p 1-12, 2015.
- BURG, J. S.; ESPENSHADE, P. J. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res*, v. 50, n. 4, p. 403-10, Oct 2011.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CARDOZO, M. T. et al. Chemopreventive effects of beta-ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. *J Nutr Biochem*, v. 22, n. 2, p. 130-5, Feb 2011a.

CHEN, Z. ET AL Cullin Family Proteins and Tumorigenesis: Genetic Association and Molecular Mechanisms. *Journal of Cancer* . v.6, n. 3, p. 233-242, 2015.

CLARKE, J. D et al, Characterization of hepatocellular carcinoma related genes and metabolites in human nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. v.59,n.2, p.365-374, 2014.

CUSI, K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*, v. 142, n. 4, p. 711-725 e6, Apr 2012.

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. ISSN 11791535.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two 'Hits'? *Gastroenterology*, v. 114, n. 4 I, p. 842-845, 1998.

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

DE MIGLIO, M.R. et al, Phenotypic reversion of rat neoplastic liver nodules is under genetic control. *Int J Cancer*; 105: 70-5, 2003.

DE MOURA ESPINDOLA, R. et al. Geranylgeraniol and beta-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-kappaB activation. *Carcinogenesis*, v. 26, n. 6, p. 1091-9, Jun 2005.

DE-OLIVEIRA, A.C.A.X.; FIDALGO-NETO, A.A. & PAUMGARTTEN, F. J. R. In vitro inhibition of liver monooxygenases by β -ionone, 1,8-cineole, (-)-menthol and terpineol. *Toxicology* v. 135, n.1, p.33–41, 1999

DOWMAN, J. K.; TOMLINSON, J. W.; NEWSOME, P. N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*, v. 103, n. 2, p. 71-83, 2010.

_____. Systematic review: The diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 33, n. 5, p. 525-540, 2011.

DUNCAN, R. E. et al, Geraniol and beta-ionone inhibit proliferation, cell cycle progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. *Biochem Pharmacol.* v.68, n.9, p.1739-47, 2004.

DURAZZO, M. et al. Focus on therapeutic strategies of nonalcoholic Fatty liver disease. *Int J Hepatol*, v. 2012, p. 464706, 2012.

EL-SERAG, H. B. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, v. 365, n. 12, p. 1118-27, Sep 22 2011.

FARBER, E. Clonal adaptation during carcinogenesis. *Biochem Pharmacol*, v. 39, n. 12, p. 1837-46, Jun 15 1990.

FEO, F.; FRAU, M.; PASCALE, R. M. Interaction of major genes predisposing to hepatocellular carcinoma with genes encoding signal transduction pathways influences tumor phenotype and prognosis. *World Journal of Gastroenterology*, v. 14, n. 43, p. 6601-6615, 2008.

FREEDMAN, N. D.; MARRERO, J. A. Can dietary fish intake prevent liver cancer? *Gastroenterology*, v. 142, n. 7, p. 1411-1413, 2012.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, v. 18, n. 6, p. 499-502, Jun 1972.

GARCIA, O. et al, Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutat Res* v.627,n.2, p.186-190, 2007.

GERHARD, G.S. & DISTEFANO, J.K. Micro RNAs in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* v.7, n.2,p.226-234, 2015.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 29, n. 4, p. 431-8, Apr 2009.

GUERRERIO, A. L. et al. Choline intake in a large cohort of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 95, n. 4, p. 892-900, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HARTMANN, A. et al, Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* v.18, n.1, pp.45–51, 2003.

HEBBARD, L.; GEORGE, J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v. 8, n. 1, p. 34-44, 2011.

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

HIGASHI, K. et al. Regulatory mechanism of glutathione S-transferase P-form during chemical hepatocarcinogenesis: old wine in a new bottle. *Cancer Letters*, v. 209, n. 2, p. 155-163, 2004.

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

HOSHIDA, Y. et al. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis*, v. 30, n. 1, p. 35-51, Feb 2010.

INCA, Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, p. 124, 2014.

JANAKIRAM, N. B. et al. Beta-ionone inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats, suppresses cell growth, and induces retinoid X receptor-alpha in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther*, v. 7, n. 1, p. 181-90, Jan 2008.

JONES, S. et al β -ionone induces cell cycle arrest and apoptosis in human prostate tumor cells. *Nutr Cancer*. v.65, n.4,p.600-610, 2013.

JOU, J.; CHOI, S. S.; DIEHL, A. M. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease*, v. 28, n. 4, p. 370-379, 2008.

KIKUCHI, L.; OLIVEIRA, C. P.; CARRILHO, F. J. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int*, v. 2014, p. 106247, 2014.

KIM, D. Y.; HAN, K. H. Epidemiology and Surveillance of Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer*, v. 1, n. 1, p. 2-14, Jun 2012.

KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, v. 41, n. 6, p. 1313-21, Jun 2005.

KUCERA, O. & CERVINKOVA, Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol*. v.20,n.26, p.8364-8376, 2014.

KUNO, N. & MIZUTANI, T. Influence of synthetic and natural food dyes on activities of CYP2A6, UGT1A6, and UGT2B7. *J Toxicol Environ Health A*. v.68, n.16, p.431-44, 2005.

Kuroiwa-Trzmielina, J. Atividade quimiopreventiva da tributirina na hepatocarcinogênese em ratos Dissertação de Mestrado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2007.

LARTER, C. Z.; YEH, M. M. Animal models of NASH: Getting both pathology and metabolic context right. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 23, n. 11, p. 1635-1648, 2008.

- LEE, K. P. et al. The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 18, p. 8248-8253, 2010.
- LEFEVER, S. et al. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. 7, p. 2065-2069, 2009.
- LEUNG, C. et al, Characteristics of hepatocellular carcinoma in cirrhotic and non-cirrhotic non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*.v.21,n.4, p.1189-1196, 2015.
- LEVIN, S. Apoptosis, Necrosis, or Oncosis: What Is Your Diagnosis? A Report from the Cell Death Nomenclature Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicological Sciences*, v. 41, n. 2, p. 155-156, 1998.
- Li, P. et al, Hepatic pharmacokinetics of cationic drugs in a high-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis *Drug Metabolism and Disposition* v.39, n.4, p.571-579, 2011.
- LIEBER, C. S. et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79, n. 3, p. 502-509, 2004.
- LIU, J.R. et al, Effects of beta-ionone on mammary carcinogenesis and antioxidant status in rats treated with DMBA. *Nutr Cancer*.v.62, n.1,p.58-65, 2010.
- LIU, P. et al Akt-Mediated Phosphorylation of XLF Impairs Non-Homologous End-Joining DNA Repair. *Molecular Cell* v.57, n.4, p. 648-661, 2015.
- LIU, Q. et al. Apoptosis initiation of β -ionone in SGC-7901 gastric carcinoma cancer cells via a PI3K-AKT pathway. *Archives of Toxicology*, v. 87, n. 3, p. 481-490, 2013.
- LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method v.25,n.4, p.402-408, 2001.
- LLOVET, J. M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, v. 362, n. 9399, p. 1907-1917, 2003.

LOEB, L. A.; LOEB, K. R.; ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 3, p. 776-81, Feb 4 2003.

LOOMBA, R. & SANYAL, A.J. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* v.10,n.11,p.686-690, 2013.

LOPEZ-MEJIA, I.C. & FAJAS, L. Cell cycle regulation of mitochondrial function. *Curr Opin Cell Biol.* v.33, p.19-25. 2014.

LU, L. et al. Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 4, p. 1437-1442, 2010.

LUCH, A. Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, v. 5, n. 2, p. 113-25, Feb 2005.

MARQUARDT, J. U.; THORGEIRSSON, S. S. Stem cells in hepatocarcinogenesis: Evidence from genomic data. *Seminars in Liver Disease*, v. 30, n. 1, p. 26-34, 2010.

MATTHEWS, J. N. et al. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ*, v. 300, n. 6719, p. 230-5, Jan 27 1990.

MCCARTHY, P.J. ET AL, Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis* v.12,n.4,p.209-214.

MEACHAM, C. E. & MORRISON, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity *Nature* v.501 p.328–337, 2013.

MICHELOTTI, G.A. ; MACHADO, M.V.& DIEHL, A.M.NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.v.10, n.11,p.656-665, 2013.

MILONSKI, J. et al, DNA damage and oxidant-antioxidant status in blood of patients with head and neck cancer. *DNA Cell Biol.* v.34,n.3,p.213-219, 2015.

MIN, H. K. et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab*, v. 15, n. 5, p. 665-74, May 2 2012.

MISHRA, L. et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, v. 49, n. 1, p. 318-329, 2009.

MO, H.; ELSON, C. E. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med* (Maywood), v. 229, n. 7, p. 567-85, Jul 2004.

MORENO, F. S. et al. Effect of beta-carotene on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. *Cancer Lett*, v. 96, n. 2, p. 201-8, Sep 25 1995.

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

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M. & CIOCCA, D. R. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* v.49, n.9, p. 1183–1186, 2001.

NAIK, A.; KOŠIR, R. & ROZMAN, D.; Genomic aspects of NAFLD pathogenesis. *Genomics*, v. 102, n.2, p. 84-95, 2013.

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

NAVES, M. M. V.; MORENO, F. S. DIFERENCIAÇÃO CELULAR: IMPORTÂNCIA NA HEPATOCARCINOGENÊSE E PAPEL MODULADOR DO β -CAROTENO. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 46, n. 4, p. 389-399, 2000.

NESS, G. C. Physiological feedback regulation of cholesterol biosynthesis: Role of translational control of hepatic HMG-CoA reductase and possible involvement of oxysterols. *Biochim Biophys Acta*. v.1851, n.5, p.667-673, 2015

NGUYEN, L. V. et al, Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature Reviews Cancer* , v.12, p.133-143 , 2012.

ODOUX, C. et al. A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer. *Cancer Res*, v. 68, n. 17, p. 6932-41, Sep 1 2008.

OGAWA, T. et al. A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits. *American Journal of Pathology*, v. 177, n. 1, p. 153-165, 2010.

OISHI, N.; WANG, X. W. Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells. *International Journal of Biological Sciences*, v. 7, n. 5, p. 517-535, 2011.

PETERSEN, B.E. ; ZAJAC, V.F. & MICHALOPOULOS, G.K. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology*. v.27,n.4,p.1030-1038, 1998.

PITOT, H. C. Animal models of neoplastic development. *Dev Biol (Basel)*, v. 106, p. 53-7; discussion 57-9, 143-60, 2001.

_____. Adventures in hepatocarcinogenesis. *Annu Rev Pathol*, v. 2, p. 1-29, 2007.

RAFACHO, A. et al, Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol* v.85,n.5,p.536-545, 2007.

RAGGI, C.; INVERNIZZI, P. Methylation and liver cancer. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, v. 37, n. 6, p. 564-71, Dec 2013.

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. *Clinics in Liver Disease*, v. 12, n. 4, p. 853-860, 2008.

ROSS, S. A. Nutritional genomic approaches to cancer prevention research. *Experimental Oncology*, v. 29, n. 4, p. 250-256, 2007.

_____. Evidence for the relationship between diet and cancer. *Exp Oncol*, v. 32, n. 3, p. 137-42, Sep 2010.

ROZMAN, D. From nonalcoholic Fatty liver disease to hepatocellular carcinoma: a systems understanding. *Dig Dis Sci*, v. 59, n. 2, p. 238-41, Feb 2014.

SCHULZ, P.O. et al, Association of nonalcoholic fatty liver disease and liver cancer. World J Gastroenterol v.21, n.3, p.913-918, 2015

SCHWARTZ, G. K. CDK inhibitors: cell cycle arrest versus apoptosis. Cell Cycle. v.1, n.2, p.122-123, 2002

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

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

SHUKLA, Y.; KALRA, N. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. Cancer Letters, v. 247, n. 2, p. 167-181, 2007.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 62, n. 1, p. 10-29, 2012. ISSN 1542-4863.

SILVA-OLIVEIRA, E. M.; FERNANDES, P. A.; MORAES-SANTOS, T. Effect of coffee on chemical hepatocarcinogenesis in rats. Nutr Cancer, v. 62, n. 3, p. 336-42, 2010.

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.

SIMONEN, M. et al. Desmosterol in human nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology, v. 58, n. 3, p. 976-82, Sep 2013.

SIPERSTEIN, M. D. Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. J Lipid Res, v. 25, n. 13, p. 1462-8, Dec 15 1984.

SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. Nature, v. 263, n. 5579, p. 701-703, 1976.

SPORN, M. Anticarcinogenesis studies with vitamin A and its analogs. Environmental Health Perspectives, v. Vol.16, p. 185, 1976.

SPORN, M. B. et al. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc*, v. 35, n. 6, p. 1332-8, May 1 1976.

SU, E.; ZHANG, N.N.; HO, P.C. Determination of tributyrin and its metabolite butyrate in Wistar rat plasma samples by gas chromatography/ mass spectrometry. *Mass Spectrometry* v.18 p.2217-2222.

SUKOWATI, C. et al The expression of CD90/Thy-1 in hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study. *PLoS One*. v.8, n.10, p. 1-11.

SUN, B.; KARIN, M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *Journal of Hepatology*, v. 56, n. 3, p. 704-713, 2012.

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

TACER, K.F. & ROZMAN, D. Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *Journal of Lipids* v.2011, p1-14, 2011.

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

TILG, H. & MOSCHEN, A. R. Evolution of Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Multiple Parallel Hits Hypothesis. *HEPATOLOGY* v.52, p. 1836-1846, 2010.

TSAI, Y. C. et al. Differential regulation of HMG-CoA reductase and Insig-1 by enzymes of the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell*, v. 23, n. 23, p. 4484-94, Dec 2012.

TURINETTO, V. & GIACHINO, C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res.* v.43, n.5,p.2489-2498, 2015.

VAN ROOYEN, D. M. et al. Pharmacological cholesterol lowering reverses fibrotic NASH in obese, diabetic mice with metabolic syndrome. *J Hepatol*, v. 59, n. 1, p. 144-52, Jul 2013.

VUPPALANCHI, R.; CHALASANI, N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology*, v. 49, n. 1, p. 306-17, Jan 2009.

WALENBERGH, S. M. et al. Non-alcoholic steatohepatitis: the role of oxidized low-density lipoproteins. *J Hepatol*, v. 58, n. 4, p. 801-10, Apr 2013.

WALY RAPHAEL, S.; YANGDE, Z.; YUXIANG, C. Hepatocellular carcinoma: focus on different aspects of management. *ISRN Oncol*, v. 2012, p. 421673, 2012.

WANG, Y. et al. Nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet promotes diethylnitrosamine-initiated early hepatocarcinogenesis in rats. *International Journal of Cancer*, v. 124, n. 3, p. 540-546, 2009.

WREE, A. et al, From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. v.10,n.11, p.627-636, 2013.

XIANG S. et al, Oval cell response is attenuated by depletion of liver resident macrophages in the 2-AAF/partial hepatectomy rat. Xiang S, Dong H-H, Liang H-F, et al. Oval Cell Response Is Attenuated by Depletion of Liver Resident Macrophages in the 2-AAF/Partial Hepatectomy Rat. *Rénia L, ed. PLoS ONE* v.7, n. 4, p.1-9.2012

XU, R. H. et al, Profiling of differentially expressed microRNAs (miRNAs) during differentiation of rat hepatic oval cells (HOCs) into hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *Clin Transl Oncol*. v.17, n.3,p.230-237, 2015.

YEGANEH, B. et al, Targeting the mevalonate cascade as a new therapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease. *Pharmacology & Therapeutics* v.143, n.1,p.87–110

YILMAZ, Y. et al, Linking nonalcoholic fatty liver disease to hepatocellular carcinoma: from bedside to bench and back. *Tumorigenesis* v.99, n.1, p.10-16, 2013.

YU, S. G. et al, Dietary beta-ionone suppresses hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *J. Agric. Food Chem*. v. 42,n. 7, p.1493–1496, 1994.

ZHAO, B. et al. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: An updated version. *Genes and Development*, v. 24, n. 9, p. 862-874, 2010.

ZHENG, T. et al. Hippo signaling in oval cells and hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*, v. 302, n. 2, p. 91-99, 2011.

Anexo 1

Anexo 1: Imagens macroscópicas representativas de fígado do grupo NT (A) ou RH (D); do grupo AS (B, E); e grupo AS + BI (C, F) de ratos submetidos ao experimento de 6 e 13 semanas, respectivamente. Imagens microscópicas de esteatose hepática microgoticular (objetiva de 40x), foco de inflamação (objetiva de 40x) e hepatócito balonizado estão representadas em G, H e I, respectivamente (objetiva de 100x) (setas). NT= não tratado; RH = hepatócito resistente; AS = NAFLD + RH; AS + BI = NAFLD + RH + BI.

Anexo 2

Anexo 2: Imagens microscópicas representativas de: marcação para GST-p em lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN, A) e em remodelação (B), objetiva de 40X; dupla-marcação de GSTp e KI67 do grupo RH (C), grupo AS (D) e grupo AS + BI (E) em pLPN, objetiva de 40X; células ovais, objetiva de 40X (F); hepatócito em apoptose, objetiva de 40X (G); cometa, objetiva de 10X. Estruturas apontadas pela seta. RH = hepatócito resistente; AS = NAFLD + RH; AS + BI = NAFLD + RH + BI.