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

ROGÉRIO PIETRO MAZZANTINI

**Efeitos dos triterpenóides ácidos oleanólico e ursólico
em ratos F344 submetidos ao modelo de
hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”**

São Paulo
2005

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

Efeitos dos triterpenóides ácidos oleanólico e ursólico em ratos
F344 submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do
“hepatócito resistente”.

Rogério Pietro Mazzantini

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2005

18278

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011183

Ficha Catalográfica

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

Mazzantini, Rogério Pietro
M477e Efeitos dos triterpenóides ácidos olenólico e ursólico
em ratos F344 submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese
do "hapatócito resistente" / Rogério Pietro Mazzantini. --
São Paulo, 2005.
163p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos
e Nutrição Experimental
Orientador: Moreno, Fernando Salvador

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

641.1 CDD

Rogério Pietro Mazzantini

Efeitos dos triterpenóides ácidos oleanólico e ursólico em ratos
F344 submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do
“hepatócito resistente”

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
orientador/presidente

Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia
1º. examinador

Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli
2º. examinador

Prof. Dr. Hélio Vannucchi
3º. examinador

Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros
4º. examinador

São Paulo, 27 de setembro de 2005.

Dedicado aos meus pais,
Roberto Mazzantini e Silvana Mazzantini,
a quem devo, entre uma infinidade de coisas,
o estímulo e as condições necessárias
para que eu pudesse chegar até este título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, visto que sem Sua permissão, nada é possível.

Agradeço a tudo e a todos os que foram colocados em meu caminho e que contribuíram das mais variadas formas para que este trabalho intelectual chegasse a termo, bem como às pessoas e fatores que induziram e facilitaram meu crescimento moral obtido durante o período de vigência do doutorado.

Com a certeza de que jamais poderia enumerar e citar a todos, transcrevo os seguintes agradecimentos como uma forma de representar os que de mim se acercaram e contribuíram comigo.

Meu sincero agradecimento ao professor Fernando Salvador Moreno, por ter permitido minha estadia no laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer, por sua orientação muito próxima, por sua insistência no melhoramento contínuo e raciocinado de cada um de seus alunos, incluso eu. Agradeço por não ter facilitado minha vida no doutorado, o que certamente teria feito de mim alguém dependente e sem espírito combativo. Agradeço por ter passado a mão em minha cabeça apenas na medida do necessário, pois do contrário teria gerado um fraco e, possivelmente, um mimado. Agradeço por ter discutido minhas idéias com a isenção de um pesquisador, o que me estimulou a sempre buscar o “mais ao fundo” das idéias, sem o que, um livre pensador verdadeiro não teria evoluído um pouco mais.

Agradeço à Profa. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino, que me indicou a pós-graduação no Departamento de Nutrição Experimental, lançando a primeira luz em um caminho que resolvi trilhar.

Minha gratidão vai também para a Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli (FMVZ-USP), que facilitou este trabalho e contribuiu com idéias e material importante que ajudaram a mim e ao grupo avançarmos em muitos momentos.

Agradeço àqueles que me estimularam com sua amizade e ajudas imprescindíveis para a execução desse trabalho, e que caminharam paralelamente no desenvolver do doutorado.

Cabe, então, um agradecimento especial a Aline de Conti, que trabalhou positivamente para a realização do projeto, e sem a qual não teria surgido muito do

que há nesta tese. Agradeço por sua amizade plena e me felicito em ver sua evolução constante.

Outros amigos do laboratório e do Departamento merecem minha gratidão pelos mais variados motivos, mas, sobretudo, pela amizade. São eles: Renato Heidor, Mariana Venâncio, Cida, Ana Lúcia, Thomas, Luiz, Roseli, Clarissa, Elaine, Carlos, Bianca, Renata, Mônica, Aderuza, Gracieli, Joice, Joana e Lurdinha, que sempre limpou a bagunça dessa turma toda.

Agradeço à FAPESP pela bolsa de doutorado, a qual, juntamente da bolsa de mestrado, permitiram que eu vivesse com dignidade enquanto desenvolvia este trabalho. Sou grato também à FAPESP pelo auxílio ao Projeto de Pesquisa, sem o qual nada disso seria possível.

Agradeço ao Dr. J.W. Huang (SAMLONG CHEMICAL CO., LTD., China), pela gentil doação do ácido oleanólico; e aos Drs. Badmaev e Majeed (SABINSA, EUA), pela gentil doação do ácido ursólico.

Agradeço aos meus pais, Roberto e Silvana, e irmãos, Viviana e Gian, nos quais reconheci que o mundo pode ser mais.

Minha gratidão à Sílvia, por seu amor, companheirismo, carinho e estímulo, e por ter me ensinado que vale a pena acreditar em sentimentos verdadeiros e duradouros.

Agradeço ao Grupo de Estudos Espírita Doutor Eduardo Monteiro, por ter me devolvido ao Caminho, iluminando meu espírito para a verdadeira importância da vida, mantendo minha sanidade mental durante o período do doutorado, ajudando a perceber os reais motivos escondidos nos bastidores de tudo o quanto ocorreu nesta peça chamada doutorado.

Afinal, como disse o Mestre, de que adianta ao homem ganhar o mundo e perder a própria vida?

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema da ativação do NF- κ B.....	36
Figura 2 - Via resumida do mevalonato.....	44
Figura 3 - Triterpenóides ácidos ursólico e oleanólico.....	49
Figura 4 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação das atividades quimiopreventivas dos ácidos oleanólico e ursólico quando administrados a ratos F344 durante 8 semanas consecutivas e em período abrangendo consecutivamente as etapas de iniciação e promoção inicial do modelo do RH.....	57
Figura 5 - Curva de peso corpóreo de ratos F344 tratados com os ácidos oleanólico e ursólico, ou simplesmente com óleo de milho ou água (controles), e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....	70
Figura 6 - Lesões pré-neoplásicas macroscópicas em fígado de rato da linhagem F344 (grupo OM) submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....	75
Figura 7 - Digitalização de lâmina com corte histológico de fígado de rato F-344 tratado durante 8 semanas consecutivas com óleo de milho (grupo óleo, controle) e submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. LPN persistente.....	78
Figura 8 - Digitalização de lâmina com corte histológico de fígado de rato F-344 tratado durante 8 semanas consecutivas com óleo de milho (grupo controle) e submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. LPN em remodelação.....	78

Figura 9 - Expressão do gene que codifica para a enzima HMG-CoA redutase avaliada por “dot blot” em fígado de ratos F344 submetidos ao Protocolo Experimental.....	83
Figura 10 - Dupla-marcação imunoistoquímica para LPN GST-p positiva e para BrdU. Digitalização de lâmina de corte histológico de fígado de rato F344 tratado durante 8 semanas consecutivas com óleo de milho (grupo OM, controle) e submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....	87
Figura 11 - Exemplo de corpúsculo apoptótico detectado em corte histológico de fígado de rato F344 corado com hematoxilina e eosina (H&E) em luz normal transmitida (A), e a mesma região do corte observada em microscopia de fluorescência (B).....	90
Figura 12 - Exemplo de “cometas” de hepatócitos de ratos F344, (A) do grupo Normal e (B) tratados com óleo de milho (grupo OM) durante 8 semanas consecutivas e submetido ao modelo do “hepatócito resistente”.....	95
Figura 13 - Filme fotográfico mostrando captura de quimioluminescência de “western blot” da proteína p65 de extratos nucleares (A), totais (B) e citoplasmáticos (C) de fígado de ratos F344 submetidos ao Protocolo Experimental	97
Figura 14 - “western blot” da proteína p65 de extratos nucleares de fígado de ratos F344 submetidos ao Protocolo Experimental.....	98
Figura 15 - “western blot” da proteína p65 de extrato protéico total de fígado de ratos F344 submetidos ao Protocolo Experimental	100
Figura 16 - “western blot” da proteína p65 de fração citoplasmática de fígado de ratos F344 submetidos ao Protocolo Experimental	102

Figura 17 - A) LPN persistente marcada para p53. **B)** Detalhe de imunomarcção citoplasmática de p53 em hepatócitos de uma LPN persistente.....104

Figura 18 - Controle positivo para marcação imunoistoquímica de p53, carcinoma de células escamosas.....105

Figura 19 - A) LPN persistente marcada para bcl-2. **B)** Detalhe de imunomarcção citoplasmática de bcl-2 em hepatócitos de uma LPN persistente.....109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pesos corpóreos inicial e final, bem como peso relativo do fígado de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....	71
Tabela 2 - Incidência e número de nódulos hepáticos macroscopicamente visíveis de ratos da linhagem F344 normais e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....	73
Tabela 3 - Porcentagens de nódulos hepáticos macroscopicamente visíveis e com dimensões de <1, 1, 2, 3, 4 e 5 mm, de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....	74
Tabela 4 - Número médio de LPN (totais, persistentes e em remodelação) GST-p positivas por cm ² de tecido hepático, dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....	76
Tabela 5 - Área média (mm ²) de LPN (totais, persistentes e em remodelação) GST-p positivas, dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....	79
Tabela 6 - Porcentagem da área do corte de tecido hepático ocupada por LPN (totais, persistentes e em remodelação) GST-p positivas, dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....	80
Tabela 7 - Concentração plasmática de colesterol total de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....	81

Tabela 8 - Concentração média e desvio padrão de DNA em mg/100g de tecido hepático de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....84

Tabela 9 - Número médio de hepatócitos imunoistoquimicamente marcados para BrdU por mm² de corte histológico de fígado de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH, discriminando-se tecido não pré-neoplásico, LPN persistentes e em remodelação.....85

Tabela 10 - Quantificação de corpúsculos apoptóticos hepáticos (número/mm²) de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e de tecido não pré-neoplásico ao redor das LPN (focos e nódulos de hepatócitos), e das próprias LPN, sejam elas totais, persistentes ou em remodelação dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....88

Tabela 11 - Índice de Crescimento Ajustado de tecido hepático de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e de tecido não pré-neoplásico ao redor das LPN (focos e nódulos de hepatócitos), e das próprias LPN, sejam elas totais, persistentes ou em remodelação dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.....92

Tabela 12 - Comprimento dos “Cometas” (μm) dos fígados de ratos da linhagem F344 dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH, bem como dos hepatócitos dos ratos tratados ou não com peróxido de hidrogênio (controles positivo e negativo, respectivamente).....93

Tabela 13 - Porcentagem (%) de LPN com marcação imunoistoquímica de p53 citoplasmática, em ratos F344 dos grupos Água, OM, AO e AU e submetidos ao modelo do RH.....106

Tabela 14 - Porcentagem (%) de LPN persistentes (PER) e em remodelação (REM) do total de LPN com marcação imunoistoquímica de p53 citoplasmática, em ratos F344 dos grupos Água, OM, AO e AU e submetidos ao modelo do RH.....106

Tabela 15 - Porcentagem (%) de LPN com marcação imunoistoquímica mais intensa de bcl-2, em ratos F344 dos grupos Água, OM, AO e AU e submetidos ao modelo do RH.....107

Tabela 16 - Porcentagem (%) de LPN persistentes (PER) e em remodelação (REM) do total de LPN com marcação imunoistoquímica mais intensa de bcl-2, em ratos F344 dos grupos Água, OM, AO e AU e submetidos ao modelo do RH.....108

RESUMO

MAZZANTINI, R. P. Efeitos dos triterpenóides ácidos oleanólico e ursólico em ratos F344 submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”. 2005. 163 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Avaliou-se os efeitos dos ácidos oleanólico (AO) e ursólico (AU), triterpenóides presentes em alimentos vegetais e especiarias, quando administrados a ratos F344 durante as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” (RH). Os ratos receberam durante 8 semanas, por entubação gástrica e dissolvido em óleo de milho (OM): AO ou AU (8 mg/100 g de peso corpóreo [p.c.]). Os grupos controle receberam apenas OM (0,25 mL/100 g de p.c.; grupo OM), ou água (0,25 mL/100 g de p.c.; grupo Água). O grupo Normal não recebeu qualquer tratamento. O agente iniciante foi uma dose de dietilnitrosamina (DEN, 20 mg/100 g de p.c.). Após 2 semanas de entubação, aplicou-se 3 doses diárias consecutivas de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) (2 mg/100 g de p.c.) e fez-se uma hepatectomia parcial a 70%, acrescida de 1 dose de 2-AAF (0,5 mg/100 g de p.c.) 4 dias após a cirurgia. Em 6 semanas após a iniciação, os animais foram sacrificados. Resultados: A análise macroscópica demonstrou que AO não determinou alterações e AU tendeu a aumentar o número de nódulos de hepatócitos, comparados ao grupo OM. A análise morfométrica das lesões pré-neoplásicas (LPN) hepáticas positivas para glutathione S-transferase forma placentária (GST-p), demonstrou que AO e AU não determinaram alterações no número médio de LPN persistentes, porém reduziram o número médio de LPN em remodelação, comparados ao grupo OM ($p < 0,05$). AO e AU não determinaram alterações na área média das LPN persistentes, mas diminuíram a área média das LPN em remodelação, comparados ao grupo OM ($p < 0,05$). AO e AU não determinaram alterações na área do corte ocupada por LPN persistentes, mas diminuíram a área do corte ocupada por LPN em remodelação, comparados ao grupo OM ($p < 0,05$). Os grupos Água, OM e AU apresentaram aumento na concentração plasmática de colesterol, comparados ao grupo Normal. AO promoveu aumento da expressão do gene

que codifica para a enzima HMG-CoA redutase, comparado ao grupo Normal ($p < 0,05$), e AU promoveu aumento de expressão quando comparado aos grupos Normal, Água, OM e AU ($p < 0,05$). AO e AU não determinaram alterações nos índices de proliferação celular (imunoistoquímica para bromodeoxiuridina [BrdU]) nas LPN persistentes. AU promoveu aumento ($p < 0,05$) na proliferação celular nas LPN em remodelação quando comparado ao grupo OM. AO e AU não determinaram alterações na apoptose em LPN persistentes, mas aumentaram o número médio de corpúsculos apoptóticos nas LPN em remodelação ($p < 0,05$). O Índice de Crescimento Ajustado (apoptose/proliferação celular) dos grupos demonstrou que, nas LPN persistentes, a proliferação celular tem predominância sobre a apoptose. Nas LPN em remodelação, a apoptose tem preponderância sobre a proliferação celular. Os danos no DNA hepático (método do “cometa”) foram maiores no grupo AO ($p < 0,05$) e AU ($p = 0,061$), comparados ao grupo OM. A análise por “imunoblot” revelou que o modelo do “RH” aumentou a expressão e a ativação do fator de transcrição NF- κ B ($p < 0,05$). AO e AU aumentaram a expressão e a ativação de NF- κ B, comparados ao grupo OM ($p > 0,05$). Observou-se que a proteína supressora de tumor p53 está acumulada no citoplasma dos hepatócitos de 77,2% (Água), 66,5% (OM), 69,6% (AO) e 69,7% (AU) das LPN persistentes, e de 22,8% (Água), 33,5% (OM), 30,4% (AO) e 30,3% (AU) das LPN em remodelação marcadas para p53. A proteína anti-apoptótica bcl-2 apresentou aumento de expressão em 78,4% (Água), 72,6% (OM), 73,0% (AO) e 70,4% (AU) das LPN persistentes, e de 21,6% (Água), 27,4% (OM), 27,0% (AO) e 29,6% (AU) das LPN em remodelação marcadas para bcl-2. Conclusões: AO e AU não apresentaram atividade quimiopreventiva nas condições de estudo, mas diminuíram as LPN em remodelação. O aumento da apoptose e diminuição da proliferação celular estão envolvidos com a remodelação. O fator de transcrição NF- κ B está envolvido com a hepatocarcinogênese. AO e AU aumentaram a expressão e a ativação de NF- κ B. O acúmulo de p53 no citoplasma, bem como a expressão aumentada de bcl-2 estão relacionados ao fenótipo das LPN persistentes.

Palavras-chave: quimioprevenção, NF- κ B, p53, bcl-2, danos no DNA, HMG-CoA redutase.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Neoplasias.....	17
1.2 Quimioprevenção do Câncer.....	40
1.3 Ácidos Oleanólico e Ursólico.....	47
2 OBJETIVOS.....	53
2.1 Geral.....	53
2.2 Específicos.....	54
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1 Triterpenóides Utilizados no Estudo de Quimioprevenção.....	55
3.2 Animais.....	55
3.3 Modelo de Hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”.....	55
3.4 Protocolo Experimental.....	56
3.5 Aplicação da BrDU e Sacrifício dos Animais.....	58
3.6 Exame Macroscópico dos Fígados.....	58
3.7 Análise Morfométrica de LPN Hepáticas Positivas para a GSTP.....	59
3.8 Marcação Imunoistoquímica da GST-P.....	59
3.9 Procedimento para Quantificação de LPN GSTP Positivas.....	60
3.10 Determinação das Concentrações Hepáticas de DNA.....	61
3.11 Proliferação Celular.....	62
3.12 Avaliação da Apoptose.....	62
3.13 Imunohistoquímica de p53 e bcl-2.....	63
3.14 Preparação do Extrato Protéico de Fígado.....	63
3.15 Preparação do Extrato Protéico Nuclear.....	64
3.16 Western Blotting.....	64
3.17 Avaliação da Expressão do Gene que Codifica para a Enzima HMGCoA Redutase pelo Método de “Dot Blot”.....	65
3.18 Determinação das Concentrações de Colesterol Plasmático Total.....	67

3.19 Avaliação de Danos no DNA hepático.....	67
3.20 Análise Estatística.....	68
4 RESULTADOS.....	69
4.1 Crescimento dos Animais.....	69
4.2 Quantificação de LPN Macroscopicamente Visíveis nos Fígados.....	72
4.3 Quantificação de LPN (focos e nódulos de hepatócitos) GST-p Positivas.....	76
4.4 Concentrações Plasmáticas de Colesterol Total.....	81
4.5 Avaliação da Expressão do Gene que Codifica para a Enzima HMG-CoA Redutase.....	82
4.6 Concentração de DNA Determinada pelo Método de Burton.....	84
4.7 Contagem de Hepatócitos Marcados Imunoistoquimicamente para BrdU.....	84
4.8 Contagem de Corpúsculos Apoptóticos.....	88
4.9 Índice de Crescimento Ajustado.....	91
4.10 Verificação da Intensidade dos Danos no DNA (técnica do COMETA).....	93
4.11 Análise de p65 Nuclear por “western blot”.....	96
4.12 Expressão de p65 Hepático por “western blot”.....	99
4.13 Avaliação da Presença de p65 no Citoplasma por “western blot”.....	101
4.14 Imunoistoquímica de p53.....	103
4.15 Imunoistoquímica da Proteína bcl-2.....	107
5 DISCUSSÃO.....	110
5.1 Dose dos Ácidos Oleanólico e Ursólico.....	110
5.2 Ausência de Quimioprevenção por Parte dos Triterpenóides Observada à Macroscopia do Fígado.....	112
5.3 Microscopia do Fígado e Contagem das LPN GST-P Positivas.....	115
5.4 Ausência de Diminuição dos Níveis de Colesterol Plasmático nos Grupos Tratados com AO e AU.....	120
5.5 Proliferação Celular.....	121
5.6 Apoptose.....	122
5.7 Remodelação das LPN.....	124
5.8 Danos no DNA.....	128
5.9 Expressão e Ativação de NF- κ B.....	130

5.10 Acúmulo de p53 Citoplasmática em LPN.....	133
5.11 Aumento da Expressão de bcl-2 e Acúmulo Citoplasmático de p53.....	135
5.12 Ativação de p65 e Acúmulo de p53 no Citoplasma.....	136
5.13 Originalidade do Trabalho.....	137
6 CONCLUSÕES.....	139
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
SUMMARY.....	162

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasias

A definição mais aceita para neoplasia é do patologista Rupert Willis, segundo o qual "neoplasia é uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede e não está coordenado ao crescimento dos tecidos normais e que persiste mesmo cessada a causa que a provocou". Os cânceres são conseqüências de alterações genéticas e epigenéticas envolvendo uma variedade de genes que são fundamentais para os processos de proliferação e diferenciação celular e para a apoptose (EVANS, 1993). O termo câncer se refere a um amplo grupo de doenças caracterizadas por alterações celulares de diferentes origens (GREAVES, 2002). Assim, descreve-se a existência de mais de uma centena de cânceres distintos (HANAHA e WEINBERG, 2000) que apresentam, de forma geral, expressão gênica alterada em suas células, que proliferam desordenadamente, invadem outros tecidos e comprometem suas funções normais (FENECH, 2002; LOEB et al., 2003).

Mais de 10 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer todos os anos. É calculado que haverá 15 milhões de casos novos todos os anos antes de 2020. O câncer causa 6 milhões de mortes todo ano, ou 12% de mortes mundialmente (OMS, 2004).

Ferlay e colaboradores (2001) estimaram, para o ano de 2000, que o número de casos novos de câncer no mundo seria mais de 10 milhões, dentre os quais, 53% dos casos ocorreriam nos países em desenvolvimento. Os tumores de pulmão (902 mil casos novos) e próstata (543 mil) foram os mais freqüentes no sexo masculino, enquanto que no sexo feminino observaram-se as maiores ocorrências de tumores de mama (1 milhão de casos novos) e colo do útero (471 mil).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2005 apontam que ocorrerão 467.440 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do de pele não melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e de mama e colo do útero para o sexo feminino, acompanhando a mesma magnitude observada no mundo.

No Brasil, são esperados 229.610 casos novos para o sexo masculino e 237.830 para sexo feminino. Estima-se que no ano de 2005, o câncer de pele não melanoma (113 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), próstata (46 mil), cólon e reto (26 mil), pulmão (26 mil), estômago (23 mil) e colo do útero (21 mil).

Os tumores mais incidentes para o sexo masculino, serão devidos ao câncer de pele não melanoma (56 mil casos novos), próstata (46 mil), pulmão (17 mil), estômago (15 mil) e cólon e reto (12 mil). Para o sexo feminino, destacam-se os tumores de pele não melanoma (57 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (21mil), cólon e reto (14 mil) e pulmão (9 mil) (INCA, 2005).

As infecções pelos vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV) consistem na causa predominante do câncer primário de fígado, que quase sempre se desenvolve em um fígado cirrótico. Outros fatores de risco incluem o consumo excessivo de bebidas alcoólicas e cigarros, ingestão insuficiente de hortaliças, ingestão de arsênico inorgânico, exposição ao dióxido de tório radioativo, sobrecarga de ferro e exposição a aflatoxinas (CHEN et al., 1997; KEW et al., 1997; MONTESANO et al., 1997 e World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 1997).

Carcinogênese é um termo geral utilizado para se denotar a gênese da neoplasia (PITOT e DRAGAN, 1991; PITOT, 2001). Esta neoplasia pode ser entendida como um aumento autônomo do número de células, independente ou não de estímulos por fatores extra-celulares tais como hormônios, ao contrário da hiperplasia, que por definição consiste na proliferação de células dependente de tais fatores de estimulação (BANNASCH, 1986; BANNASCH e ZERBAN, 1990).

As neoplasias podem ser *benignas* ou *malignas*. As primeiras se referem a neoplasias que apresentam uma proliferação celular localizada e circunscrita, exercendo pressão nos tecidos adjacentes, mas que não infiltram tecidos vizinhos. Em contraste, neoplasias malignas ou *cânceres*, têm a capacidade de invadir e se multiplicar em diferentes partes do organismo (SMUCKLER, 1983).

Dessa forma, a definição de uma pré-neoplasia deve incluir etapas prévias do desenvolvimento de neoplasias tanto benignas quanto malignas. Portanto, uma pré-neoplasia não é idêntica a um pré-câncer, podendo ser descrita em nível histológico, como populações de células fenotipicamente alteradas e que não apresentam natureza neoplásica óbvia, mas que têm possibilidade de progredir para neoplasias benignas ou malignas (BANNASCH, 1986; BANNASCH et al., 2001).

Pode-se considerar a carcinogênese como um processo ativo induzido em organismos vivos por uma série de agentes químicos ou físicos, que podem ser agrupados em três categorias distintas, ou seja, aqueles responsáveis pela carcinogênese biológica, física, química (PITOT e DRAGAN, 1991).

Na carcinogênese biológica, o agente consiste de macromoléculas com peso molecular relativamente elevado, o DNA ou RNA, responsáveis pela transmissão de informação; em contrapartida, a carcinogênese por radiação pode ser consequência das ações diretas ou indiretas de fótons de elevada energia ou partículas sobre o DNA existente. Já no caso da carcinogênese atribuível a muitas substâncias químicas de menor peso molecular, isto pode envolver a ação direta do composto químico com o DNA celular, ou a ação do seu metabólito ativo, que pode então reagir com o DNA, produzindo uma alteração permanente em sua estrutura (PITOT e DRAGAN, 1991).

A capacidade dos agentes carcinógenos de se ligarem aos ácidos nucleicos foi demonstrada pela primeira vez in vivo por Magee e Farber (1962). A partir dessa observação, reconhece-se, hoje em dia, que a maioria deles reage quimicamente com o DNA por meio da transferência a este ácido nucleico de resíduos alquila, formando deste modo produtos estáveis conhecidos como adutos (VENITT, 1994; DIPPLE, 1995). Assim, grupamentos eletrofílicos altamente reativos dessas substâncias carcinogênicas promovem ataques a grupamentos nucleofílicos da molécula de DNA, formando adutos que, caso não eliminados pelo sistema de reparo, poderão originar no genoma transições, transversões e pequenas deleções (PITOT, 2001). As transições são substituições de uma pirimidina por outra, ou de uma purina por outra; logo, um par GC é trocado por um AT ou vice-versa. As transversões são menos comuns e consistem de trocas de purinas por pirimidinas, ou vice-versa; portanto, por exemplo, um par AT torna-se TA. Deleções, por sua vez, são perdas de bases do material genético (WILLIAMS, 1980; BERTRAM, 2000; MARTINEZ et al., 2003).

Nesse sentido, existem carcinogênicos genotóxicos que apresentam grupamentos eletrofílicos em sua estrutura ou que podem ser, ainda, biotransformados a intermediários eletrofílicos (WILLIAMS, 2001). Para tanto, é necessária a ação de enzimas da fase I de biotransformação, podendo-se destacar as do sistema citocromo P450. Reações de fase I envolvem oxidação, redução e hidroxilação tornando a molécula mais hidrofílica e suscetível a detoxificação. Assim,

embora muitas vezes essas reações ativem o carcinogênico, em alguns casos podem também resultar em sua inibição. Já as reações de fase II de biotransformação, que envolvem enzimas como a glutathione S-transferase e UDP-glicuronil transferase, resultam em conjugação de moléculas como a glutathione com metabólitos de fase I de biotransformação, tornando esses últimos mais polares e passíveis de excreção (VERHOEVEN et al., 1997).

Carcinogênicos que não necessitam de ativação prévia são denominados de carcinogênicos diretos, enquanto que os indiretos (ou pró-carcinogênicos) são convertidos a carcinogênicos definitivos após metabolização por enzimas de fase I (VENITT, 1994). Exemplos de carcinogênicos diretos são as nitrosamidas (alquil nitrosouréia), o bis(cloro) metil éter e a mostarda nitrogenada. Já as aminas aromáticas do tipo 2-acetilaminofluoreno e 2-naftilamina, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (como por exemplo o benzopireno, as aflatoxinas, nitrosamidas e nitro-compostos aromáticos) ou heterocíclicos do tipo dos nitrofuranos, constituem pró-carcinogênicos (FARBER, 1984; VENITT, 1994; DIPPLE, 1995).

Tem-se descrito que o desenvolvimento do câncer consiste em um processo longo envolvendo múltiplas etapas na transformação das células normais em malignas, requerendo para isso aproximadamente de metade a 2/3 da vida das diferentes espécies (FARBER, 1991). Entretanto, é bastante discutível o número exato de etapas que compõem o processo carcinogênico, existindo evidências de que a neoplasia ocorra em três estágios básicos denominados iniciação, promoção e progressão (PITOT et al., 1996).

O primeiro estágio do processo carcinogênico, conhecido como etapa de iniciação, caracteriza-se por alteração permanente e irreversível no material genético da célula iniciada. Mutações específicas em sítios de lesões ocorridas no DNA durante sua replicação ou durante o reparo de protooncogenes seriam responsáveis pelo processo de iniciação, e um ciclo de proliferação celular fixaria tais mutações. A partir desse momento a célula iniciada pode se transformar em maligna, se receber ou não estímulos promotores de malignidade (HEMMINKI, 1993).

A etapa subsequente à iniciação é representada pela promoção, que, por sua vez, apresenta longa duração (SING e GABY, 1991). Nessa etapa ocorre a expansão clonal seletiva das células iniciadas, pela ação de um agente promotor, formando assim lesões pré-neoplásicas (FARBER, 1990; KLAUNIG et al., 2000; PITOT, 2001; YOUNG et al., 2003). Agentes promotores atuam por mecanismos que

não envolvem danos no DNA, como, por exemplo, alterando a expressão gênica, estimulando a proliferação celular das células iniciadas e inibindo a apoptose nas mesmas (KLAUNIG et al., 2000; WILLIAMS, 2001; YOUNG et al., 2003). É importante ressaltar que tais ações requerem a presença constante do agente promotor. Assim, diferentemente da iniciação, a promoção é caracterizada pela sua reversibilidade que resulta da remoção do agente promotor (PITOT, 2001). Exemplos de tais agentes são o fenobarbital, bifenil policlorados, e hormônios como o estradiol (KLAUNIG et al., 2000; WILLIAMS, 2001).

No último estágio, a progressão, o tecido torna-se neoplásico, podendo ser considerado benigno ou maligno, e é caracterizado por sua evolução e instabilidade cariotípica, além de sua irreversibilidade. Alterações na estrutura do genoma das células estão relacionadas, nesta etapa, com uma taxa de proliferação aumentada, com o caráter invasivo e alterações bioquímicas nas células (PITOT e DRAGAN, 1991; YOUNG et al., 2003).

Sabe-se que a proliferação celular desempenha um papel importante, e até mesmo crítico, nas diversas etapas da carcinogênese de diversos órgãos e tecidos, ou seja, na iniciação, promoção e progressão (TOMATIS, 1993; FARBER, 1995).

Deve-se ressaltar, no entanto, que nem todos os agentes capazes de induzir a proliferação celular estão necessariamente envolvidos com a carcinogênese. Além disso, tecidos com altas taxas de proliferação celular, como por exemplo o intestino delgado, não apresentam maior risco de desenvolvimento de câncer (TOMATIS, 1993; FARBER, 1995).

Observa-se que a etapa de progressão é marcada por alterações irreversíveis no genoma da célula, afetando, por exemplo, as expressões de fatores de crescimento positivos (TGF α e IGFII), bem como ativando alguns protooncogenes celulares ou inativando genes supressores tumorais (PITOT et al., 1996).

Protooncogenes são genes normais que quando ativados como oncogenes, desregulam as vias de crescimento, proliferação e diferenciação celulares (WEINSTEIN, 1988).

Genes supressores de tumores são genes normais que quando inativados, desregulam as vias de crescimento e diferenciação celulares, aumentando a probabilidade de transformação neoplásica (HARRIS, 1991). Dentre estes, o gene *p53* é o mais estudado. O produto do gene *p53* é uma fosfoproteína envolvida com o

controle do ciclo celular, além de também participar no reparo do DNA e na apoptose (KASTAN et al., 1991; STANLEY, 1995).

O padrão de desenvolvimento da neoplasia maligna do fígado em ratos é semelhante ao que se observa em humanos (FARBER e SARMA, 1987; SU et al., 1997; BANNASCH et al., 2003; SU e BANNASCH, 2003). Desta forma, modelos de hepatocarcinogênese vêm sendo considerados dentre os melhores para o estudo da gênese e desenvolvimento *in vivo* de neoplasias (HUFF, 1993; GRASL-KRAUPP et al., 1994).

Diversos modelos foram descritos para o estudo da hepatocarcinogênese química. Dentre os vários protocolos de hepatocarcinogênese existentes para ratos, o modelo do “hepatócito resistente” (RH), descrito em 1976 (SOLT e FARBER, 1976) e modificado em 1987 (SEMPLE-ROBERTS et al., 1987), está bem caracterizado e é suficiente para induzir elevada incidência de cânceres.

O modelo consiste na administração única de um agente iniciante, no caso a dietilnitrosamina (DEN), por via intraperitoneal. Após duas semanas, os ratos recebem, via intragástrica, 3 doses de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF, 2 mg/100 g de peso corpóreo/dia), um potente agente mito-inibitório dos hepatócitos normais, e, 24 horas após a última dose, estes são submetidos a uma hepatectomia parcial a 70%, responsável por intenso estímulo proliferativo celular. Quatro dias após a cirurgia, administra-se uma dose de 2-AAF (0,5 mg/100 g de peso corpóreo/dia), também por intubação gástrica (SOLT e FARBER, 1976; SEMPLE-ROBERTS et al., 1987).

Este modelo baseia-se na hipótese de que o 2-AAF é capaz de inibir a proliferação da maioria dos hepatócitos normais, mas não a dos resistentes que foram gerados durante a iniciação.

Além disso, tem como característica o fato de produzir lesões pré-neoplásicas (LPN) e neoplásicas de forma sincronizada, possibilitando estudos mais detalhados.

Seu desenvolvimento baseou-se, também, na hipótese agora já bastante comprovada de que diversos carcinogênicos químicos são capazes de produzir hepatócitos resistentes e um novo fenótipo constitutivo com um padrão bioquímico altamente característico (um *fenótipo resistente*), durante a etapa de iniciação do processo carcinogênico, se ocorrer concomitantemente um ciclo de proliferação celular. Tais hepatócitos resistentes podem ser rapidamente estimulados de modo a formarem proliferações focais (focos e nódulos pré-neoplásicos) após breve exposição não iniciante a reduzidas concentrações de alguns carcinogênicos, tais

como o 2-AAF, associada a estímulo mitogênico representado por uma hepatectomia parcial (SOLT e FARBER, 1976; FARBER e SARMA, 1987; FARBER e RUBIN, 1991; LEDA-COLUMBANO et al., 1992; PITOT et al., 1996).

A pressão de seleção para gerar focos e nódulos desse modelo é intensa, e as células resistentes proliferam, portanto, de forma sincronizada. Esta sincronia persiste pelas múltiplas etapas do processo carcinogênico (FARBER, 1984; FARBER e SARMA, 1987).

Em diversos protocolos de hepatocarcinogênese a proliferação dos hepatócitos em focos e nódulos pré-neoplásicos é bastante lenta, em geral assincrônica, necessitando muitas semanas, ou mesmo alguns meses, para que se formem nódulos hepáticos visíveis. Já no modelo do RH isto acontece, ao contrário, de forma rápida e sincronizada, de modo que nódulos precoces já podem ser observados macroscopicamente em uma ou duas semanas após a etapa de seleção/promoção inicial.

A grande maioria dos nódulos precoces desenvolvidos durante a hepatocarcinogênese do modelo do “hepatócito resistente”, cerca de 95 a 98%, sofre remodelação, um processo altamente complexo envolvendo mudanças no suprimento sanguíneo e em características bioquímicas, bem como da estrutura e arquiteturas celulares, retornando ao aspecto “normal” anterior do fígado. Esses números se referem à porcentagem de LPN que remodelam e não se tornam neoplasias, o que significa que as porcentagens podem ser diferentes de acordo com o momento em que se observa o fenômeno no fígado. Em um modelo experimental de 8 semanas, por exemplo, que é o nosso caso, a quantidade de LPN em remodelação ainda é, logicamente, menor do que a citada. Isto ocorre porque uma LPN persistente em dado instante pode vir a remodelar apenas tardiamente no processo carcinogênico. Portanto, apenas uma pequena parte das LPNs (2-5%) segue outro caminho, o da persistência, até se tornar neoplasias (TATEMATSU et al., 1983; FARBER e RUBIN, 1991; IMAI et al., 1997).

Conseguiu-se demonstrar claramente que nódulos persistentes de hepatócitos atuam como locais de futura evolução para o câncer. Assim, esses nódulos são facilmente observáveis ao redor de 7 meses após aplicação do agente iniciante, DEN. Estes nódulos persistentes demonstram sequência progressiva de evolução celular, com a ocorrência de “nódulos em nódulos” e, finalmente, aparecimento de câncer após cerca de 10-11 meses (FARBER et al., 1988).

Quando estudados em detalhe os nódulos apresentam padrões característicos de organização e estrutura celular, arquitetura e histoquímica, sendo bastante diferentes do fígado normal em quaisquer de suas etapas de desenvolvimento (OGAWA et al., 1979a; 1979b). Deve-se ressaltar, entretanto, que a pequena população de nódulos persistentes apresenta o mesmo padrão bioquímico observado na maioria dos nódulos que sofre remodelação (nódulos precoces) (FARBER e SARMA, 1987; FARBER, 1990).

Portanto, a maior parte dos nódulos persistentes têm o mesmo padrão de remodelação que a maioria dos nódulos, embora muito mais lento, não existindo evidências de que nódulos que se remodelam e aqueles que persistem representem, na verdade, duas respostas inteiramente diferentes à ação de carcinogênicos (FARBER, 1990).

Nesse sentido, apesar de uma maturação ou reversão fenotípica ter sido previamente sugerida como responsável pelo fenômeno da remodelação (KITAGAWA, 1971; KITAGAWA e PITOT, 1975; WILLIAMS, 1980), bem como não se ter podido descartar a possibilidade da ocorrência de uma reposição progressiva de hepatócitos crescendo a partir do tecido considerado “normal” ao redor dos nódulos, acredita-se, mais recentemente, que este possa envolver, na verdade, a rediferenciação dos hepatócitos dos nódulos para um fenótipo semelhante ao do adulto (TATEMATSU et al., 1983; FARBER et al., 1988; FARBER e RUBIN, 1991), ou até mesmo a morte e remodelação das células por apoptose (SCHULTE-HERRMANN et al., 1990).

De qualquer forma, a informação para este evento espontâneo, uma expressão genética bastante complexa, parece estar já normalmente inserida no genoma (FARBER et al., 1988; FARBER e RUBIN, 1991; IMAI et al., 1997). Além disso, acredita-se, ainda, que a persistência dos nódulos talvez indique justamente um bloqueio na remodelação por diferenciação (FARBER et al., 1988; FARBER e RUBIN, 1991), podendo estar relacionada com uma maior tendência de evolução para os carcinomas hepatocelulares (OHASHI et al., 1996).

A susceptibilidade à hepatocarcinogênese varia consideravelmente entre as deferentes linhagens de ratos. Linhagens tais como Fischer F344, que são comumente usadas em estudos de hepatocarcinogênese, por exemplo, são altamente susceptíveis a uma variedade de agentes carcinogênicos e desenvolvem múltiplos nódulos e carcinomas, enquanto outras linhagens como Sprague-Dawley

(SD) ou Wistar são consideradas intermediárias em sua susceptibilidade. Várias linhagens mostram uma resistência relativamente elevada à hepatocarcinogênese. Um estudo conduzido várias décadas atrás mostrou que ratos da linhagem Copenhagen (Cop) são resistentes à formação de cânceres no fígado induzidos por doses crônicas de 2-acetilaminofluoreno administrado na ração. Em tal estudo, comparando-se ratos das linhagens F344, August e Marshall com os ratos da linhagem Cop, observou-se que dentre 10 ratos Cop, apenas dois haviam desenvolvido câncer hepático, ao passo que a incidência foi de 100% nas demais linhagens. A linhagem DRH também se demonstrou relativamente resistente, com apenas 1 em cada 8 animais desenvolvendo neoplasias sob o mesmo tratamento com 2-AAF. Além disso, essa linhagem é resistente à indução de hepatocarcinogênese pelo carcinogênico 2-metil-4-dimetilaminoazobenzeno (3'-Me-DAB). Uma outra linhagem, Brown Norway (BN), mostrou-se igualmente resistente à formação de nódulos pré-neoplásicos quando submetidos a modelos de hepatocarcinogênese (WOOD et al., 2002).

Lesões neoplásicas hepáticas induzidas em linhagens de ratos resistentes ao desenvolvimento de câncer no fígado, como Wistar, BN, DRH and Cop, exibem uma menor taxa de crescimento e níveis elevados de remodelação quando comparadas às lesões da linhagem F344, que é altamente suscetível ao desenvolvimento de HCC (DE MIGLIO et al., 2003; DENDA et al., 1999). De acordo com esta idéia, foi encontrado que LPN e neoplásicas de F344 mostram expressão elevada dos genes *c-myc*, *ciclina D1*, *ciclina E*, *ciclina A* e *E2F1*. As linhagens Wistar e BN, por sua vez, apresentaram expressão diminuída desses genes em suas LPN e neoplásicas, bem como aumento de expressão de $p16^{INK4\alpha}$ (PASCALE et al., 2002).

Protocolos que permitem a separação e distinção das fases de iniciação e promoção na hepatocarcinogênese facilitam grandemente os estudos dos mecanismos celulares envolvidos durante o processo de remodelação. Assim, o modelo do hepatócito resistente (RH) é extremamente valioso para estudos que têm por finalidade observar e estudar esse fenômeno. Foi a partir dele, por exemplo, que descobriu-se que ratos das linhagens Cop e BN, ambas consideradas resistentes à hepatocarcinogênese, desenvolvem LPN tanto quanto outras linhagens, indicando que o evento da iniciação não é inibido em tais linhagens. Essas LPN dos ratos Cop, entretanto, têm taxas de remodelação maiores, resultando em relativa ausência de cânceres (WOOD et al., 2002).

A cinética do crescimento de LPN GST 7-7-positivas foi mais aprofundadamente estudada em ratos Cop, onde se observou que o desenvolvimento das LPN durante os primeiros sete dias após a hepatectomia parcial não era diferente da observada em ratos F344 e, por esta ocasião, cerca de 5% do volume do fígado mostrava-se ocupado por lesões em ambas as linhagens. Porém, aos 14 dias após a hepatectomia parcial, todos os ratos F344 apresentavam nódulos visíveis a olho nu, enquanto os fígados dos ratos Cop estavam livres deles. Além disso, a diferença entre ambas as linhagens foi observada também à microscopia, com as LPN dos ratos Cop remodelando em taxas cada vez maiores quando comparadas às dos F344 (WOOD et al., 2002).

Genes envolvidos no desenvolvimento e outros processos normais da célula estão relacionados com o câncer, podendo-se destacar os que controlam o ciclo celular (DEVEREUX et al., 1999). Este consiste em um processo pelo qual a célula se divide e é normalmente regulado por meio de mecanismos de sinais extracelulares que estimulam a expressão de determinados genes e a ativação de proteínas reguladoras (SHERR e MCCORMICK, 2002).

Para que ocorra a divisão celular um processo complexo é iniciado, em que várias proteínas são ativadas, podendo-se destacar fatores de crescimento e seus receptores, bem como proteínas que estimulam a proliferação e o desenvolvimento da célula normal. Assim, a divisão celular é positivamente regulada ou estimulada por meio de vias sinalizadoras (WARD, 2002). Apresentam papel central na proliferação celular as quinases dependentes de ciclina (CDKs), que regulam a progressão pelas fases do ciclo celular (SCHAFER, 1998) que compreendem as etapas G1, S, G2 e M. A fase G1 antecede a síntese de DNA, que ocorre na fase S. Já G2 antecede a mitose, ou seja, a fase M, em que ocorre a divisão celular propriamente dita (NURSE, 1994, PINES, 1995).

Genes estimuladores da proliferação celular incluem os protooncogenes, enquanto inibidores são os supressores de tumor. Esses últimos modulam a progressão do ciclo celular, mantendo a célula em latência, ou induzindo a sua morte, caso as condições de progressão do ciclo celular não estejam apropriadas (YONISH-ROUACH et al., 1991). O *p53* é um exemplo clássico de anti-oncogene que regula a proliferação celular e estimula a apoptose de células com danos no DNA (STEELE et al., 1998). Mutações ou modificações na expressão desses genes conferem à célula vantagens de crescimento e desenvolvimento em relação às

células normais (WARD, 2002). Os genes supressores de tumor, ou anti-oncogenes, estão envolvidos com a inibição da expressão do fenótipo maligno, podendo ser inativados por mutações durante o processo da carcinogênese (VENITT, 1994). Uma mutação que iniba esses genes poderá resultar em perda de mecanismos naturais de controle da proliferação, resultando em multiplicação excessiva das células. Os protooncogenes estão relacionados com a divisão e diferenciação celular normal. Uma vez mutados, são ativados em oncogenes e podem atuar em vias intracelulares envolvidas com o controle da proliferação celular, sem a necessidade de estímulos externos. Exemplos de protooncogenes são o *c-myc* e *c-Ha-ras* (NEMETH et al., 2003).

Desta forma, a proliferação celular desempenha um papel importante, e até mesmo crítico, nas diversas etapas da carcinogênese de diversos órgãos e tecidos, ou seja, na iniciação, promoção e progressão (TOMATIS, 1993; FARBER, 1995; MORI et al., 1999; MORI et al., 2001).

Além da proliferação celular, o destino da célula também é controlado por genes que estimulam a morte celular programada (apoptose). Essa consiste em um tipo de morte celular distinta morfológica, bioquímica e molecularmente da necrose, que visa eliminar células em excesso ou indesejáveis, de tecidos embrionários, durante a involução de órgãos e na regressão de neoplasias. Assim, a apoptose é reconhecida atualmente como um fenômeno biológico de ampla ocorrência, e que é complementar, mas se opõe à proliferação celular, no sentido de manter a homeostasia tecidual (BURSCH et al., 1994; UEDA e SHAH, 1994; COLUMBANO, 1995).

Morte celular programada é uma autodestruição da célula. Ela serve como um contrabalanço da mitose e mantém um número adequado de células nos tecidos pela eliminação de células não mais necessárias ao organismo. Além disso, a apoptose também tem a função de eliminar células que sofreram danos em seu material genético.

A ocorrência e a relevância da apoptose foi primeiramente descrita em estudos de desenvolvimento embrionário, onde observou-se que a morte celular era necessária para remover os excessos de tecidos tais como as membranas interdigitais, o ducto de Müllerian nos machos e o excesso de neurônios no encéfalo. Mais tarde, descobriu-se que esse fenômeno ocorre em uma variedade de tecidos e

condições, incluindo substituição normal de células de um tecido, regressão de órgãos e após certos tipos de injúrias celulares.

A apoptose pode ser induzida por uma série de fatores de crescimento e hormônios tróficos e é controlada pelos mecanismos regulatórios de crescimento do organismo. Todavia, durante a carcinogênese e o crescimento neoplásico, a regulação da proliferação celular e da apoptose sofrem perturbações.

As características morfológicas da apoptose, como descritas por Kerr e colaboradores (1972) e Wyllie e colaboradores (1980b), são a condensação do citoplasma, da cromatina na membrana nuclear e a fragmentação do núcleo e da célula em corpúsculos apoptóticos.

A apoptose exerce importante papel quando o mecanismo de reparo do DNA não é suficiente para evitar o dano genético. Assim, a célula mutada pode ser eliminada do organismo por essa morte celular programada, que representa um mecanismo de proteção contra a transformação e desenvolvimento do tumor, que elimina células com dano genético ou que não respondem a estímulos proliferativos (HENGARTNER, 2000; KONG et al., 2001, KANUNFRE, 2004).

Mais especificamente, no processo de apoptose células únicas inicialmente se retraem e se tornam densas. Há uma perda de água dentro do retículo endoplasmático da célula apoptótica que resulta em uma dilatação das cisternas. No núcleo, a cromatina se condensa e se junta à membrana nuclear. O núcleo também pode se fragmentar. Os corpúsculos apoptóticos então formados contém freqüentemente fragmentos de cromatina condensada que podem ser subseqüentemente fagocitados pelos macrófagos ou células vizinhas e digeridos pelos lisossomos celulares. Células ou corpúsculos apoptóticos não atraem neutrófilos e linfócitos, relacionados mais especificamente às respostas inflamatórias. Portanto, para o organismo como um todo, a apoptose constitui um processo pelo qual células com danos (não reparados) ou não necessárias podem ser removidas rapidamente (GOLDSWORTHY et al., 1996, SCHULTE-HERMANN et al., 1997; RUST e GORES, 2000).

Um evento comum em células apoptóticas é a clivagem da dupla fita do DNA, levando a fragmentos de oligonucleossomos de 180-200 pares de bases, os quais podem ser observados como um padrão de distribuição em escada ("ladder") à eletroforese em gel de agarose. Descreve-se ser uma endonuclease específica a responsável pela digestão do DNA. O "ladder" de DNA não consiste em uma

característica fundamental da apoptose (GOLDSWORTHY et al., 1996, RUST e GORES, 2000).

Ao contrário da necrose, a apoptose é um processo geneticamente programado que geralmente requer transcrição e tradução de genes ativos. Assim, por exemplo, no fígado uma série de estímulos incluindo privação alimentar, TGF-beta e fas, mostrou-se capaz de indução de sinais apoptóticos. Por outro lado, vários fatores de crescimento e promotores tumorais hepáticos mostraram-se capazes de inibir a apoptose hepática (GOLDSWORTHY et al., 1996, RUST e GORES, 2000).

Descreve-se que os sinais iniciais da morte celular programada sejam o estímulo à atividade de proteases (caspases), que levam ao aumento da atividade das endonucleases, à alteração da superfície celular e reorganização do citoesqueleto. (GOLDSWORTHY et al., 1996).

A apoptose é intensamente regulada por proteínas da família bcl-2. Essas podem exercer papel pró ou antiapoptótico e participam de uma ampla variedade de cascatas de sinalização. Interações entre proteínas dessa família com outras resultam na morte ou não da célula. (FILHO, 1998; MAK e YEH, 2002).

Um outra proteína importante para o processo de apoptose é a p53. Esta consiste em uma proteína supressora de tumor, que se encontra envolvida com o reparo do DNA, controle do ciclo celular e indução da apoptose (SHERR e MCCORMICK, 2002).

Segundo Schulte-Hermann, tratando-se de LPNs, como também ocorre na maioria dos tecidos, a taxa de crescimento da população celular depende da taxa de replicação celular (α) e de morte celular (β). A resultante ($\alpha - \beta$) determina a taxa de crescimento da população. Intuitivamente, assume-se que o crescimento neoplásico derive de uma diminuição da taxa de morte celular; entretanto, este conceito não se aplica ao fígado e a uma série de outros órgãos. Estudos demonstraram que LPNs de fígado de rato apresentam não apenas um aumento de 5 a 10 vezes na taxa de duplicação celular, quando comparada à do tecido não pré-neoplásico, mas também há um aumento da taxa de morte celular por apoptose se comparada ao tecido adjacente. De maneira semelhante, hepatocarcinomas humanos exibem taxas aumentadas tanto de proliferação quanto de morte celular (SCHULTE-HERMANN et al., 1995).

A proteína p53 apresenta um papel importante na inibição da formação de neoplasias. Trata-se de uma fosfoproteína cuja localização nuclear é essencial para

a sua atividade de supressão do ciclo celular em fase tardia de G1. A p53 atua como um guardião do DNA, visto que danos causados ao genoma estimulam sua expressão e entrada no núcleo, onde bloqueia a divisão celular na fase G1 e estimula a apoptose com a finalidade de eliminar a célula geneticamente defeituosa. Além disso, a p53 contribui para eventos de diferenciação terminais (STEELE et al., 1998).

A concentração de p53 é regulada por degradação citoplasmática, e está na maioria das vezes em concentrações não detectáveis no núcleo. Ocorre sua translocação para o núcleo em resposta a algum estresse celular, como danos causados ao DNA, por exemplo. Nesses casos, a proteína torna-se transitoriamente estável e é translocada para o núcleo, onde forma um complexo tetramérico que constitui sua forma transcricionalmente ativa. Sendo um fator de transcrição de grande importância, a p53 liga-se a um sítio presente em seqüências regulatórias de genes p53-dependentes, os quais facultam o bloqueio da divisão da célula que sofreu o dano ou a sua apoptose, impedindo que a informação genética alterada, indesejável, seja herdada por células filhas (FABBRO & HENDERSON, 2003).

A inativação da p53 é um evento comum em neoplasias humanas e está presente em pelo menos 50% de todos os cânceres estudados. A mutação é o mecanismo mais estudado para sua inativação, e é freqüentemente encontrada em alguns cânceres como, por exemplo, o de mama, de cólon, de pulmão e gliomas, sendo em sua maior parte a deleção de um alelo. Tais alterações modificam a conformação da proteína e prolongam sua meia-vida, causando, assim, sua acumulação nuclear (MOLL et al., 1995).

Apesar de a mutação ser o mecanismo mais estudado de alteração da funcionalidade de p53, descreve-se outra maneira de impedir sua atividade nuclear, que é a sequestração da proteína em nível citoplasmático (MOLL et al., 1995). Tal fenômeno foi primeiramente observado em modelos de oncogênese viral, como os induzidos por SV-40 e adenovirus tipo 5. Em ambos os casos, uma proteína específica a essas partículas virais forma um complexo estável com a p53, inativando-a. Em outros casos, o complexo leva à degradação do fator de transcrição, impedindo igualmente sua atividade nuclear, como é o caso da oncoproteína HPV-16/18 E6 (SCHEFFNER et al., 1990).

Além dessas, existem formas endógenas pelas quais a atividade de p53 pode ser bloqueada, inibindo sua localização nuclear, que é essencial para sua função

como supressor de tumores. Por exemplo, descreve-se que neuroblastomas primários não apresentam mutação de p53, mantendo-se esta proteína em seu estado selvagem. Porém, a mesma encontra-se claramente acumulada no citoplasma das células não diferenciadas, com concomitante exclusão do núcleo. Esse sequestro de p53 no citoplasma foi intimamente relacionado a uma falha na diferenciação e aumento da malignidade. Portanto, nesse caso, a acumulação citoplásmica refletiu uma incapacidade de translocação nuclear devido a um bloqueio na maturação celular (MOLL et al, 1995).

Relata-se que a p53 pode ser exportada do núcleo por uma proteína denominada Mdm2. Além dessa, várias proteínas têm sido propostas para explicar o ancoramento citoplasmático de p53, incluindo proteínas ribossomais, Hsc70, vimentina, tubulina, F-actina, receptores de glicocorticóides, Parc e bcl-2. Alterações nas quantidades ou mesmo mutações com ganho ou perda de função dessas proteínas poderiam levar a um descontrole da regulação de p53 (NIKOLAEV *et al.*, 2003).

A proteína citoplasmática Parc está criticamente envolvida na regulação da localização subcelular de p53, e foi demonstrado que o acúmulo de p53 citoplásmico está associado ao Parc, que se liga a ele por meio do domínio C-terminal do fator de transcrição. Na ausência de estresse celular, a inativação de Parc leva à ativação de p53 por meio da indução de sua translocação nuclear. Porém, em células de neuroblastoma, observou-se uma quantidade bastante elevada de Parc, que prevenia a translocação de p53 mesmo em condições de estresse celular genotóxico. Além disso, quando a concentração de Parc foi artificialmente diminuída por meio da técnica de RNAi, a atividade de p53 foi restaurada. Assim, foi sugerido que Parc funcione como uma âncora que retém a p53 ao citoplasma e, desta forma, regula sua localização subcelular (NIKOLAEV et al., 2003).

Ainda segundo esses autores, sendo a p53 alvo de modificações pós-tradução na célula em condição de estresse, é possível que a fosforilação e/ou acetilação da mesma possa regular sua interação com Parc. Também foi sugerido que Parc atue juntamente com Mdm2, sendo esta última responsável pelo controle de exportação de p53 do núcleo concomitantemente à sua degradação mediada por ubiquitinação. Mdm2 seria um dos componentes centrais da regulação de p53, impedindo sua atividade em células não estimuladas para a via de p53 (WOODS e VOUSDEN, 2001).

Existem poucos relatos de estudos de p53 em pré-neoplasias. Dentre esses, são ainda mais raros os estudos de p53 em lesões pré-neoplásicas de fígado. Um dos mais completos é o trabalho de Van Gijssel e colaboradores (2000), em que grupos de ratos Wistar foram submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH) e receberam doses de radiação (raios-X) em diferentes períodos para estimular a ativação de p53. Após o sacrifício, os fígados foram coletados e preparados por técnicas de imunoistoquímica para avaliar focos GST7-7+ (forma placentária de glutathione S-transferase, GST-p), bem como as presenças de p53, bcl-2 e Mdm2 (VAN GIJSSEL et al., 2000).

Segundo esses autores, a irradiação aumentou a porcentagem de ratos cujos fígados tinham marcação positiva para p53. Mas a observação mais importante foi que os hepatócitos do tecido ao redor das lesões, ou "surrounding", apresentavam intensa marcação nuclear, enquanto que os focos GST7-7+ não apresentam marcação nuclear, e sim citoplasmática. De acordo com os autores, esta marcação citoplasmática seria o reflexo de uma incapacidade de a p53 ser translocado para o núcleo, onde exerceria sua atividade como fator de transcrição. A localização citoplasmática de p53 nos focos pré-neoplásicos pode representar uma tentativa da célula em combater os danos genéticos inerentes aos próprios focos. Todavia, essa tentativa falha, uma vez que a p53 não consegue atingir o núcleo.

Ainda segundo esses autores, a expressão elevada de Mdm2 e bcl-2 nas LPN pode ser a razão para o ancoramento de p53 no citoplasma. Além disso, foi sugerido que a expressão aumentada de Mdm2 poderia ser um evento comum em células pré-neoplásicas para escaparem ao controle de p53.

Além disso, foi sugerido pelo grupo que a resistência das lesões aos efeitos mitoinibitórios do 2-AAF seria consequência de uma incapacidade de expressar p53 nuclear, ao invés de uma diminuição da bioativação do 2-AAF, segundo a idéia mais aceita (VAN GIJSSEL et al., 2000).

A desregulação da apoptose tem sido indicada como um passo importante nas diferentes fases do processo carcinogênico, inclusive da hepatocarcinogênese. Sendo a morte celular programada uma maneira intrínseca ao organismo de eliminar células com muitos defeitos ou danos em seu genôma, considera-se que um tecido pré-neoplásico ou neoplásico tenha uma taxa de apoptose menor do que a taxa de proliferação celular. Dessa maneira, esses tecidos teriam uma tendência a aumentar em volume e número de células.

Em relação aos mecanismos moleculares que regulam a apoptose, muitas proteínas participam do processo de morte celular programada. Por exemplo, descreve-se que os membros da família de proteínas bcl-2 são importantes reguladores da apoptose, tanto por induzi-la (bax e bak), quanto por inibi-la (bcl-X_L, BAG-1 e bcl-2), e esses membros podem formar homodímeros e heterodímeros entre si. Sabe-se que o equilíbrio entre membros indutores e inibidores pode determinar o destino da célula. Por este motivo, foram observadas alterações na expressão de vários membros da família bcl-2 em vários tipos de câncer (CHRISTENSEN et al., 1999; REED, 1998).

O papel específico de bcl-2, um dos membros dessa família de reguladores da apoptose, seria o de inibir a apoptose; logo um aumento de sua expressão significaria para a célula uma menor tendência de sofrer morte programada. Portanto, o acúmulo dessa proteína citoplasmática seria um indicativo de estado patológico se considerada a carcinogênese. Nesse sentido, foi observado um aumento da apoptose em hepatócitos de camundongos “knockout” para bcl-2, indicando que esta proteína anti-apoptótica contribui para o controle da morte celular programada no tecido hepático (CHRISTENSEN et al, 1998).

Descreve-se expressão anormal de bcl-2 em carcinomas hepatocelulares (ZHAO et al., 1994). Em relação à hepatocarcinogênese, em estudo publicado em 1997, Lee demonstrou que tumores induzidos em fígados de camundongos por dietilnitrosamina eram positivamente marcados para bcl-2 (LEE, 1997).

Além disso, Christensen e colaboradores (1999), executando alguns experimentos em camundongos nos quais foram induzidas LPN, carcinomas e adenomas em fígados de animais tratados com os carcinógenos não genotóxicos fenobarbital e o proliferador de peroxissomos WY-14, analisaram a expressão de bcl-2 em cada instância. Em relação às LPN, descreveu-se expressão elevada de bcl-2 em 86% das lesões basofílicas e em 12% das acidofílicas. Mais de 85% dos adenomas basofílicos e 13% dos acidofílicos apresentaram aumento de expressão para bcl-2. Dentre os carcinomas, 81% eram positivamente marcados para bcl-2 em relação ao tecido adjacente (CHRISTENSEN et al., 1999).

Também Iida e colaboradores (2000), analisando e comparando diferenças na expressão de bcl-2 por meio de imunoistoquímica no fígado, observaram aumento de marcação desta proteína anti-apoptótica em 25% das LPN, 57,1% dos adenomas hepáticos e em 100% dos carcinomas hepáticos (IIDA et al., 2000).

Descoberto em 1986 como uma proteína com atividade ligadora de DNA, o NF- κ B tem sido intensamente estudado por seu papel no controle da expressão de genes envolvidos com a resposta imunológica, inflamação, proliferação celular e carcinogênese. Sua relação com o processo neoplásico reside, em parte, no fato deste fator de transcrição ser capaz de induzir a expressão de genes que controlam a proliferação celular e inibem a apoptose (CHU et al., 1997), tais como os que são induzidos pelo fator de necrose tumoral (TNF), oncogenes e estresse genotóxico. Os fatores NF- κ B consistem em dímeros de proteínas da família Rel, sendo conhecidos cinco membros: p50/105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2), c-Rel, RelB, e p65 (RelA).

Em células não estimuladas por condições de estresse que levam à sua ativação, NF- κ B está presente em uma forma citoplasmática não ativa, condição esta mediada pela proteína inibitória I κ B, que se liga ao NF- κ B impedindo sua passagem para o núcleo celular, onde este exerce sua atividade (BEG et al., 1992; BEG et al., 1993). Várias proteínas I κ B foram caracterizadas, incluindo I κ B α , I κ B β , I κ B γ , p105 (NF- κ B1), p100 (NF- κ B2) e Bcl-3. Há uma relação auto-regulatória entre NF- κ B e seu inibidor I κ B α , com o fator nuclear estimulando a produção de seu próprio inibidor. A transcrição de I κ B α , por exemplo, é regulada por NF- κ B, uma vez que o promotor do gene que codifica para I κ B α contém sítios funcionais para NF- κ B (DUCKETT et al., 1993; LE BAIL et al., 1993).

Fosforilação de I κ B resulta em sua rápida ubiquitinação e subsequente proteólise pelo proteassomo 26S (**Figura 1**). A degradação de I κ B resulta na libertação de NF- κ B, levando este fator de transcrição a se acumular no núcleo da célula, onde ativa a expressão de genes específicos (BALDWIN, 1996; GHOSH et al., 1998). A fosforilação de I κ B ocorre em resposta a vários fatores, tais como espécies reativas de oxigênio, ésteres de forbol, TNF, citocinas pró-inflamatórias, hipóxia, interleucina-1, lipopolissacarídeo bacteriano e vírus.

Mutações no gene que codifica para I κ B α foram detectadas em linfoma de Hodgkin, tendo-se sugerido que este contribuiu para com a atividade constitutiva aumentada de NF- κ B nestas células, uma vez que há perda da regulação do fator de transcrição (CABANNES et al., 1999).

A inibição de NF- κ B pela expressão de uma forma modificada de I κ B α (I κ B α super-repressor) bloqueou a formação de focos de células transformadas por H-Ras oncogênico em células NIH 3T3 (FINCO et al., 1997).

Uma linhagem mutante de linfócitos pré-B, incapaz de fosforilar e degradar $I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$ e $I\kappa B\epsilon$, falhou na ativação de NF- κ B em resposta a alguns estímulos, incluindo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), taxol e interleucina-1 (IL-1) (COURTOIS et al., 1997).

Figura 1 - Esquema da ativação do NF- κ B.

P= fosforilação

I- κ B= inibidor de NF- κ B

Muitas evidências indicam que NF- κ B tem um papel importante no desenvolvimento do câncer e de metástases. Retrovírus que codificam v-rel, um homólogo viral de c-rel, são extremamente oncogênicos para galináceos. Genes que codificam para proteínas c-Rel estão localizados próximos a regiões envolvidas em rearranjos e ampliações do genoma (GILMORE et al., 1996; LUQUE et al., 1997).

Mukhopadhyay e colaboradores (1995) verificaram uma expressão aumentada de p50 em linhagens celulares e também em NSCLC (câncer de células pulmonares não pequenas), sugerindo que esta expressão alterada possa ser uma característica freqüente deste tipo de câncer, que poderia resultar no estímulo ou inibição da transcrição de genes importantes no processo de carcinogênese.

Em diversas linhagens de células de carcinoma de tireóide humana, a atividade de NF- κ B e o nível de expressão da subunidade p65 apresentaram-se elevados, sugerindo que este fator de transcrição possa ser um componente importante para a transformação celular. Duas destas linhagens de células quando tratadas com oligonucleotídeos antisentido para p65 apresentaram bloqueio da malignidade, observado pela inibição da proliferação celular e diminuição da expressão do proto-oncogene *c-myc* (VISCANTI et al., 1997).

Kitajima e colaboradores (1992), bem como Higgins e colaboradores (1993), avaliando o potencial terapêutico de oligonucleotídeos antisentido de p65, verificaram que estes promoveram inibição da carcinogênese em camundongos “nus”, bem como regressão de cânceres estabelecidos. Os autores sugerem, respectivamente, que a expressão de NF- κ B possa ser necessária à manutenção do fenótipo maligno, e que os resultados obtidos poderiam ser decorrentes da interferência em mecanismos de adesão celular.

A redução da capacidade de adesão celular e proliferação em ágar verificadas em células de fibrosarcoma da linhagem K-BALB tratadas com oligonucleotídeos antisentido para relA, seria decorrente da inibição da atividade de NF- κ B e conseqüente diminuição da expressão de TGF-B1 (PEREZ et al., 1994).

Beauparlant e colaboradores (1994), por meio da expressão induzida por transfecção de mRNA antisentido de I κ B α em células NIH 3T3 murinas, verificaram que os níveis da proteína I κ B α diminuíram, resultando em uma atividade aumentada de NF- κ B e em transformação maligna. Além disto, verificaram a produção de neoplasias quando estas células foram injetadas em camundongos “nus”. Neste

caso, a transformação maligna das células NIH 3T3 poderia ser resultado da perda da ação regulatória de I κ B α sobre NF- κ B.

As mudanças fenotípicas observadas em células humanas de câncer de mama em estágio avançado da doença, tais como alta capacidade invasiva e capacidade de formar metástases, bem como resistência à quimioterapia, seriam em parte consequência da atividade constitutiva de NF- κ B, possivelmente resultante da perda de receptores funcionais para estrógeno (NAKSHATRI et al., 1997), e dos níveis reduzidos de I κ B α e I κ B β (NEWTON et al., 1999).

Possuindo o NF- κ B atividades relacionadas a um aumento da proliferação celular e inibição da apoptose, pode-se considerar que os fatores de transcrição NF- κ B e p53 apresentam atividades distintas em relação à sobrevivência da célula. Por esta razão, a definição do destino a ser tomado pelos processos celulares depende, em condições celulares normais, do nível de expressão de cada uma dessas entidades. Isso ocorre porque NF- κ B inibe a transativação p53-dependente, ao passo em que a expressão de p53 pode igualmente suprimir a atividade transcricional de NF- κ B. Essa relação entre esses fatores de transcrição existe devido ao fato de eles formarem complexo com os mesmos coativadores, no caso as proteínas p300 e CREB-binding protein (CBP). Portanto, p53 e NF- κ B competem pelos mesmos coativadores (WEBSTER e PERKINS, 1999).

A proliferação celular em tecido hepático apresenta um papel importante na hepatocarcinogênese, como anteriormente mencionado, e pode ser classificada em dois tipos: hiperplasia compensatória e hiperplasia direta (FARBER e SARMA, 1987).

A hiperplasia direta pode ocorrer por meio de dois mecanismos distintos. Um deles pode ser após a administração de algum proliferador de peroxissomos (PP), como o clofibrato, ou de ácido retinóico 9-*cis*, enquanto o outro mecanismo pode ser ativado por certas substâncias mitogênicas, como o nitrato de chumbo e o dibrometo de etileno. Desta forma, descreve-se que heterodímeros de receptores ativados de proliferador de peroxissomos (PPARs) e receptores de retinóides (RXRs) apresentam um papel importante na hiperplasia direta induzida por PP e ácido retinóico 9-*cis*, enquanto que a ativação de NF- κ B e AP-1 não estaria envolvida com este tipo de hiperplasia (CONI et al., 1993; OHMURA et al., 1996).

Já a hiperplasia compensatória ocorre após a perda de células hepáticas, como uma hepatectomia parcial ou uma necrose celular, como a induzida por griseofulvina.

Nagao e colaboradores avaliaram a atividade de NF- κ B na proliferação de hepatócitos induzida por griseofulvina, onde demonstraram sua ativação. Após administração de griseofulvina foi demonstrado que a expressão dos genes de PPAR α e RXR α estava reduzida, enquanto que AP-1 e NF- κ B estavam ativados, indicando que estes fatores de transcrição são importantes na hiperplasia compensatória e hepatocarcinogênese induzida por este tratamento (NAGAO et al., 1998). O modelo de hepatocarcinogenicidade do hepatócito resistente (RH), comumente aplicado nos experimentos de nosso grupo utiliza justamente uma hiperplasia compensatória induzida por dose necrogênica iniciante (200 mg/kg de peso corpóreo) de dietilnitrosamina (DEN) e por uma hepatectomia parcial. Portanto, essas informações constituíram-se em indícios da participação de NF- κ B no modelo do RH e induziram a investigação desse fator de transcrição neste estudo.

Recentemente, no decorrer da condução deste estudo, observou-se que o NF- κ B está realmente ativado em modelos murinos de heparocarcinogênese, na fase de LPN (CARRASCO-LEGLEU et al., 2004). Esta informação foi confirmada pelo grupo, em recente publicação (ESPÍNDOLA et al., 2005).

1.2 Quimioprevenção do Câncer

Apesar de não ser novo o conceito de que a alimentação e o estado nutricional podem influenciar o câncer, até há não muitos anos atrás este tipo de interação recebeu, surpreendentemente, pouca atenção por parte da comunidade científica.

Durante a década de 60 e 70, estudos epidemiológicos investigaram os padrões de incidência de cânceres na população (PERRY, 1975; DOLL, 1977; WYNDER e GORI, 1977), a distribuição demográfica e socioeconômica, os efeitos da migração (HAENSZEL e KURIHARA, 1968; HAENSZEL et al., 1972; WEISBURGER e RAINERI, 1975; KAGAWA, 1978) e hábitos alimentares em

diferentes grupos populacionais (PHILLIPS, 1975), possibilitando que se chegasse à conclusão que fatores nutricionais desempenhavam, efetivamente, importante papel na etiologia e, inclusive, na prevenção de cânceres (COMMITTEE ON DIET, NUTRITION AND CANCER; NATIONAL RESERACH COUNCIL, 1982).

Uma marco, entretanto, para essa área do conhecimento, foi a revisão de Doll e Peto, publicada em 1981, onde esses epidemiologistas ingleses sugerem que seria plausível reduzir em 35% (com uma variação de 10 a 70%) a mortalidade por câncer nos EUA, por meio de modificações a serem realizadas na alimentação.

Frutas e hortaliças são componentes importantes de uma dieta saudável, e o seu consumo diário suficiente poderia ajudar a prevenir doenças cardiovasculares e certos cânceres. Calcula-se que até 2,7 milhões de vidas poderiam ser potencialmente salvas a cada ano se o consumo de frutas e hortaliças fosse aumentado. Um relatório de WHO/FAO recentemente publicado recomenda o consumo de um mínimo de 400g de frutas e hortaliças por dia (excluindo batatas e outros tubérculos amiláceos) para a prevenção de doenças crônicas cardiovasculares, câncer, diabete e obesidade, como também para a prevenção de várias deficiências de micronutrientes, especialmente em países menos desenvolvidos. Há evidências científicas crescentes que demonstram que um consumo insuficiente de frutas e hortaliças é um fator de risco fundamental para vários doenças crônicas não transmissíveis (OMS, 2004).

Como principais fatores protetores ressalta-se os papéis de vitaminas antioxidantes, de hortaliças que contenham esses compostos, e de microconstituintes dos alimentos, como por exemplo, indóis e inibidores de protease. Fibras, ou alimentos que tornam as fezes volumosas foram também citadas como importantes. Além disso, aspectos da alimentação mencionados como possíveis causas de câncer foram o consumo de alimentos em excesso (cânceres de útero e vesícula biliar em mulheres), as gorduras (cânceres de mama, cólon e reto) e carnes (cânceres de cólon e reto). Dez anos mais tarde Doll (1992) reviu suas conclusões, continuando a afirmar que “a estimativa de que o risco de câncer fatal pode ser reduzido em 35% por meio de modificações na alimentação, continua a ser razoável”.

A quimioprevenção do câncer, definida pela primeira vez por Sporn e colaboradores, pode ser considerada uma forma de se prevenir a doença, por meio da administração de um ou mais compostos químicos durante as etapas iniciais pré-

neoplásicas da carcinogênese, ou seja, na fase de iniciação ou promoção, e antes do estabelecimento da etapa de progressão (SPORN et al., 1976; WATTENBERG, 1985; ALBERTS e GARCIA, 1995; HONG e SPORN, 1997; PEZZUTO, 1997).

É grande o número de compostos até agora identificados com eventual atividade quimiopreventiva contra o câncer (WATTENBERG, 1985; BOONE et al., 1990; MORSE e STONER, 1993; SHARMA et al., 1994; ARNOLD et al., 1995; ALBERTS e GARCIA, 1995; PEZZUTO, 1997; STONER et al., 1997). Diversos dos inibidores da carcinogênese até agora identificados são constituintes naturais dos alimentos (DRAGSTED et al., 1993; AMES et al., 1995; EL-BAYOUMY et al., 1997). Portanto, a investigação dos mecanismos por meio dos quais a alimentação influencia o câncer, está não só contribuindo para a elucidação de aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, como também pode ter ainda um grande impacto em estratégias de prevenção (ROGERS et al., 1993; AMES et al., 1995).

Nos últimos anos, Moreno e colaboradores têm procurado avaliar a atividade quimiopreventiva do β -caroteno e da vitamina A e elucidar mais especificamente em quais etapas da hepatocarcinogênese estes atuam. Assim, verificaram a ação inibitória do derivado isoprênico - β -caroteno - no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (focos e nódulos de hepatócitos) de ratos Wistar submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH), quando administrado por intubação gástrica dissolvido em óleo de milho, principalmente durante período que abrangia as fases de iniciação e seleção/promoção concomitantemente ou apenas a etapa de iniciação, mas também quando aplicado tão somente durante a fase de promoção precoce da hepatocarcinogênese. Dentre os mecanismos de ação sugeridos nesses trabalhos para explicar as atividades quimiopreventivas desses derivados isoprênicos, destacam-se a inibição da proliferação celular, redução de células "ovais", aumento da remodelação de LPN e inibição da expressão da enzima que catalisa a síntese do mevalonato, a HMG-CoA redutase, por mecanismos pós-transcricionais (MORENO et al., 1991, 1995; RIZZI et al., 1997; RIZZI et al., 1998; DAGLI et al., 1998; SILVEIRA et al., 1998; NAVES et al., 2000).

Foram demonstrados por Moreno e colaboradores os efeitos inibitórios dos ácidos retinóicos *todo-trans* e *9-cis* na proliferação celular em ratos Wistar na etapa de progressão de hepatocarcinogênese (SILVEIRA et al., 2001). Também foram

demonstrados os efeitos do β -caroteno e da vitamina A sobre a diminuição da proliferação de células ovas de fígado e o aumento da expressão de conexina 43 durante a diferenciação hepática (NAVES et al., 2001).

Mais recentemente, foi demonstrado pelo grupo que os derivados isoprênicos β -ionona e geranilgeraniol apresentaram atividade quimiopreventiva no modelo do RH. Os mecanismos de ação sugeridos para essa atividade foram a inibição da proliferação celular, proteção contra danos no DNA e inibição da ativação de NF- κ B pelo geranilgeraniol (ESPÍNDOLA et al., 2005).

Há um aumento recente no interesse pelo estudo dos derivados do metabolismo do mevalonato de plantas, denominados isoprenóides, em função de sua promissora ação relatada na quimioprevenção e quimioterapia do câncer (ELSON e YU, 1994; MORENO et al., 1995; GOULD, 1995; CROWELL, 1999; ELSON et al., 1999). Plantas têm a capacidade de sintetizar uma enorme quantidade de produtos naturais derivados de uma unidade comum isoprênica de 5 carbonos, que são classificados como isoprenóides. Estas substâncias diferem em tamanho, complexidade e função, tendo sido caracterizados cerca de 22.000 em plantas (BACH, 1995).

Os isoprenóides denominados “puros” são aqueles constituídos exclusivamente por múltiplos de unidades isoprênicas, como monoterpenos (duas unidades), sesquiterpenos (três unidades), diterpenos (quatro unidades), triterpenos (seis unidades), tetraterpenos (oito unidades) e politerpenos (n unidades), enquanto que aqueles denominados “mistos”, apresentam, por sua vez, apenas partes de suas moléculas derivada da via dos isoprenóides (BACH, 1995; SACCHETTINI, 1997). Dois triterpenóides específicos derivados do metabolismo do mevalonato foram o enfoque deste estudo, a saber, os ácidos oleanólico e ursólico.

Frutas, hortaliças e grãos de cereais constituem fontes ricas em derivados do metabolismo do mevalonato (ELSON e YU, 1994). Por meio da via do mevalonato é formado um número excepcional de isoprenóides encontrados em plantas, podendo-se citar dentre eles o geraniol, farnesol, geranilgeraniol, esteróis, dolicol, ubiquinona, carotenóides, ácido oleanólico e ácido ursólico (STERMER et al., 1994) (**Figura 2**).

A primeira etapa na biossíntese de isoprenóides em plantas e do colesterol em animais é a formação de pirofosfato de isopentenila a partir de acetil CoA. Este conjunto de reações inicia-se com a formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA

(HMGCoA), que a seguir é reduzida a mevalonato (STRYER, 1995). A síntese do mevalonato consiste na etapa crítica desse metabolismo, sendo catalisada pela enzima HMGCoA redutase (EC 1.1.1.34) (STRYER, 1995). A seguir, o mevalonato é convertido em pirofosfato de isopentenila (C_5) por meio de 3 reações consecutivas envolvendo gasto de ATP.

Assim, adições sucessivas de unidades isoprênicas, ou seja, de pirofosfato de isopentenila, formam geraniol (C_{10}) e farnesol (C_{15}). A partir deste ponto, esta via metabólica se divide em duas: a primeira envolve a extensão do farnesol, resultando em cadeias com quantidades aumentadas de unidades isoprênicas, como fitol (C_{20}), dolicol (C_{70-120}) e borracha ($C_{2800-20.000}$), enquanto que a segunda envolve a ligação de dois resíduos de farnesol, formando o esqualeno (C_{30}) que, por sua vez, é convertido a lanosterol. O colesterol é formado a partir do lanosterol após várias etapas, incluindo a perda de 3 grupamentos metila (STRYER, 1995; KOOLMAN e ROHM, 1996). O esqualeno é considerado o precursor da biosíntese de esteróides e triterpenóides tais como os ácidos oleanólico e ursólico (PRICE et al., 1987).

Além de diversas outras funções, o colesterol é um dos principais componentes da membrana plasmática. Desempenha papel essencial na manutenção da integridade celular e na regulação da fluidez da membrana. Participa, ainda, direta ou indiretamente, de funções envolvidas com a proliferação celular de tecidos normais e malignos (COLEMAN e LAVIETES, 1981; MARTINEZ-BOTAS et al., 2001).

Figura 2 - Via resumida do mevalonato. Adaptada de Crowell *et al.*, 1991; Bach, 1995; Elson, 1995. Os números indicam o número de carbonos da molécula.

Assim, um aumento na síntese de colesterol foi observado após hepatectomia parcial (DESSÍ et al., 1986), na hiperplasia hepática de ratos diabéticos tratados com insulina (DESSÍ et al., 1988) e de nódulos hepáticos de ratos submetidos a protocolo de hepatocarcinogênese (LEDA-COLUMBANO et al., 1985).

Na maioria destes modelos o aumento na síntese de colesterol precedeu e acompanhou a síntese de DNA.

A HMGCoA redutase constitui uma enzima cuja atividade é uma das mais reguladas na natureza. Em animais esta é modulada por um controle multivalente, sendo reprimida por produtos esteróis como o colesterol, e não esteróis, derivados do metabolismo do mevalonato (GOLDSTEIN e BROWN, 1990). Os mecanismos de controle da atividade desta enzima podem envolver a inibição parcial da transcrição do DNA por meio da ação de esteróis sobre o elemento 1 de resposta a esterol (SER 1), a inibição da tradução do mRNA por isoprenóides não esteróis derivados do mevalonato, e a degradação da enzima via proteólise, estimulada por esteróis e não esteróis atuando conjuntamente (NAKANISHI et al., 1988; GOLDSTEIN e BROWN, 1990; MAYER et al., 1991).

Isoprenóides acíclicos como o geraniol, o citral (FITCH et al., 1989), licopeno (FUHRMAN et al., 1997), e cíclicos como o β -caroteno (MORENO et al., 1995) e mentol (CLEGG et al., 1982), inibem a enzima HMGCoA redutase por meio de mecanismos pós-transcricionais. Tem sido descrito que os isoprenóides cíclicos (CLEGG et al., 1982), e acíclicos "mistos" (PARKER et al., 1993) estimulam a degradação da enzima por meio da elevação de farnesol celular, ou, ainda, atuando como homólogos deste.

Precusores do metabolismo do colesterol tais como o mevalonato e/ou derivados isoprênicos exercem, adicionalmente, eventual efeito nas fases iniciais da síntese de DNA (QUESNEY-HUNEEUS et al., 1979; HABENICHT et al., 1980).

Lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do fígado (SIPERSTEIN, 1984), bem como outras neoplasias (SIPERSTEIN, 1964), apresentam perda do mecanismo de retro-regulação inibitória da atividade da enzima HMGCoA redutase.

No entanto, a sensibilidade da enzima HMGCoA redutase à regulação inibitória dos isoprenóides é mais elevada em tecidos neoplásicos do que em tecidos esterologênicos. Em consequência de tal inibição, estaria limitada a disponibilidade de intermediários derivados da via do mevalonato, necessários para a modificação pós-tradução de proteínas relacionadas com a proliferação celular. Esta poderia ser

uma possível explicação para a atividade inibitória do crescimento de neoplasias, constatada após administração de isoprenóides. (ELSON, 1995; MORENO et al., 1995; ELSON et al., 1999; ESPÍNDOLA et al., 2005).

Assim, a inibição da via do mevalonato, mais especificamente de células neoplásicas, poderia eventualmente se constituir em uma abordagem efetiva para a quimioprevenção e quimioterapia do câncer (GOLDSTEIN e BROWN, 1990; ELSON e YU, 1994; MORENO et al., 1995; ELSON et al., 1999).

Nesse sentido, He et al. (1997) testaram diversos isoprenóides quanto a seus respectivos potenciais de inibição da proliferação de células da linhagem B16 de melanoma murínico, verificando que os inibidores mais potentes, neste caso, foram os tocotrienóis e o farnesol. Estes autores constataram, ainda, que o γ -tocotrienol e a β -ionona foram capazes de inibir o crescimento dessas células quando implantadas em camundongos.

Da mesma forma, em outro experimento observou-se também que o γ -tocotrienol e a β -ionona, isoprenóides que inibem a atividade da enzima HMGCoA redutase, suprimiram a proliferação de células B16 de camundongos, bem como de células leucêmicas HL-60 e de adenocarcinomas de mama (MCF-7) e de cólon (Caco-2) humanos. Nestes casos, o tratamento com isoprenóides resultou em um bloqueio do ciclo celular em G1 e em um estímulo da apoptose (MO e ELSON, 1999).

Diversos trabalhos têm demonstrado que isoprenóides são capazes de induzir o processo de morte celular programada. Assim, por exemplo, descreveu-se que o farnesol foi capaz de induzir a apoptose em células CEM-C1 de leucemia aguda humana (VOZIYAN et al., 1995), enquanto que o geranilgeraniol, por sua vez, exerceu a mesma ação sobre células COLO320 DM de adenocarcinoma de cólon e células Molt-3 de leucemia linfoblástica e HL-60 de leucemia promielocítica. Nestas últimas, os autores observaram uma inibição praticamente seletiva da síntese de DNA, que segundo os mesmos, poderia ativar o processo de apoptose (OHIZUMI et al., 1995).

Desse modo, a supressão do crescimento de neoplasias pelos isoprenóides parece estar relacionada à inibição da proliferação celular, bem como a um estímulo da apoptose (ELSON, 1995; HE et al., 1997, MO e ELSON, 1999)

Em concordância com essas observações, Crowell (1999), em revisão, discute a relação entre monoterpenos e câncer, ressaltando como atributos quimiopreventivos ideais desses agentes, uma ação antineoplásica eficaz em animais de experimentação, disponibilidade comercial, baixo custo, biodisponibilidade oral e reduzida toxicidade, o que os tornaria candidatos potenciais para estudos de quimioprevenção contra o câncer, agora em seres humanos.

A importância do estudo da enzima HMGCoA redutase denota a necessidade de se avaliar a participação dos triterpenóides ácido oleanólico e ácido ursólico em sua expressão, uma vez que se descreve que estes triterpenóides apresentam propriedades quimiopreventivas.

Observou-se que os níveis de HMGCoA redutase eram proporcionais ao grau de proliferação celular durante os desenvolvimentos fetal e neonatal, na regeneração pancreática, bem como em neoplasias com diferentes taxas de proliferação celular (RAO, 1986).

Demonstrou-se, ainda, que compactina, mevinolina e outros inibidores da enzima HMGCoA redutase são capazes de inibir a síntese *in vitro* de DNA (GOLDSTEIN et al., 1979; KANDUTSCH e CHEN, 1977; BROWN e GOLDSTEIN, 1974). Além disto, a ativação de NF- κ B, um fator de transcrição envolvido na ativação de vários genes, incluindo alguns relacionados com a proliferação celular e o câncer, foi atenuada por atorvastatina, um inibidor da enzima HMGCoA redutase. Os mecanismos de ação propostos para explicar este fenômeno foram: a estatina poderia ajudar a manter um nível elevado de expressão de I κ B, o inibidor de NF- κ B, ou inibir alguns passos de sua fosforilação, prevenindo sua degradação (ORTEGO et al., 1999).

1.3 Ácidos Oleanólico e Ursólico

Os ácidos oleanólico e ursólico (**Figura 3**) são isômeros triterpenóides amplamente distribuídos em alimentos, plantas medicinais e outros vegetais sem interesse alimentício, comercial ou medicinal. São encontrados, por exemplo, em beterraba, ginseng, orégano, sabugueiro, alecrim, eucalipto, alfavaca, erva-cravo e em mais de uma centena de espécies de plantas, muitas delas usadas pela cultura

popular como plantas medicinais ou como temperos. Há um interesse crescente em relação a estas substâncias por parte dos pesquisadores devido às suas propriedades farmacológicas, podendo-se citar dentre elas efeitos antioxidantes, hepatoproteção, efeitos nas dislipidemias, aterosclerose, e efeitos antineoplásicos, além de outras atividades (LIU et al., 1995).

Descreve-se que os ácidos oleanólico e ursólico encontram-se em concentrações variadas nos diferentes vegetais onde são sintetizados. Por exemplo, o orégano (*Origanum vulgare* L.) apresenta 3.100 ppm de ácido ursólico e 4.700 ppm de ácido oleanólico. No manjerição (*Ocimum basilicum* L.), relata-se 1.740 ppm de ácido ursólico e 1.300 ppm de ácido oleanólico. Na Sálvia (*Salvia officinalis* L.), descreve-se uma concentração de 1.300 ppm de ácido ursólico e 400 ppm de ácido oleanólico. Já o Tomilho (*Thymus serpyllum* L.) apresenta concentrações de 4.800 ppm de ácido oleanólico e 9.100 ppm de ácido ursólico (Phytochemical Database, 2005).

Estes triterpenóides são considerados pouco tóxicos, e a DL_{50} do ácido oleanólico administrado pela via oral, a ratos, por exemplo, corresponde a 2,0 g/kg. Além disto, nenhuma anormalidade foi constatada no cérebro, coração, pulmão, fígado, rins, tireóide, testículos, estômago, baço ou intestino de ratos tratados diariamente com 180 mg/kg de ácido oleanólico, pela via oral, durante 10 dias (Human Med. Inst., 1977).

Figura 3 - Triterpenóides ácidos ursólico e oleanólico.

Foi demonstrado que a administração do ácido oleanólico em ratos induziu uma diminuição da degeneração de células parenquimatosas, da esteatose e necrose de fígado induzidas por tetracloreto de carbono (CCl₄) (MA et al., 1982, *apud* LIU, 1995). Além disto, este foi capaz de prevenir cirrose crônica induzida por CCl₄ ou etanol em ratos (HAN et al., 1981, *apud* LIU, 1995). Da mesma forma, relatou-se que o ácido oleanólico apresentou atividade hepatoprotetora contra o acetaminofeno, cádmio, bromobenzeno, faloidina, tioacetamida, furosemida, colchicina e a D-galactosamina associada à endotoxina. Entretanto, descreve-se que este foi ineficaz contra o álcool alílico, dimetilnitrosamina, α -amanitina e clorofórmio (LIU et al., 1995).

Demonstrou-se que o ácido ursólico, por sua vez, é o princípio ativo presente em *Sumbucus chinesis* (MA et al., 1986), *Solanum incanum* (LIN et al., 1988), *Tripterospermum tiawanense* (GAN e LIN, 1988, *apud* LIU, 1995) e *Eucalyptus* (SHUKLA et al., 1992), que apresentam atividade hepatoprotetora contra o CCl₄. Este também protege contra a D-galactosamina e acetaminofeno (SHUKLA et al., 1992, *apud* LIU, 1995), e é mais potente do que o ácido oleanólico na diminuição de alterações químicas induzidas em fígado de camundongos (LIU et al., 1993, *apud* LIU, 1995).

Assim, os mecanismos de hepatoproteção descritos para os ácidos oleanólico e ursólico não são completamente conhecidos e, desta forma, mais estudos são necessários para uma maior compreensão desta propriedade.

As propriedades hipolipêmicas e anti-aterogênica dos ácidos oleanólico e ursólico foram originalmente relatadas por cientistas da União Soviética, em 1979. Assim, descreveu-se que coelhos e ratos alimentados com ácido ursólico apresentaram proteção contra aterosclerose experimental e concentrações reduzidas de colesterol (44%) e β -lipoproteína (50%) (PARFENTEVA, 1980). O tratamento da hiperlipidemia experimental de ratos com ácido oleanólico (50 mg/kg, p.o. por nove dias) reduziu as concentrações elevadas de colesterol e β -lipoproteína em mais de 40%, um efeito similar ao produzido pelo clofibrato (LIU et al., 1987). O ácido oleanólico não altera as concentrações de lipoproteínas no sangue de coelhos normais, mas reduz as concentrações anormalmente elevadas e previne a deposição lipídica nos vasos sangüíneos (MA, 1986).

Descreve-se em algumas poucas investigações que tanto a etapa de iniciação como a de promoção de neoplasias são inibidas pelos ácidos oleanólico e ursólico, sendo este seu mais notável e interessante efeito. Assim, estes triterpenóides foram identificados como os princípios ativos de *Ligustrum lucidum*, capazes de inibir a mutagenicidade produzida pelo benzopireno em bactérias (NIKAWA et al., 1993, *apud* LIU, 1995). Além disto, relatou-se que o ácido ursólico extraído de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foi capaz de inibir a ligação covalente de benzopireno ao DNA de epiderme, bem como a iniciação de neoplasia induzida por dimetilbenzantraceno (DMBA) (HUANG et al., 1994). É também o princípio citotóxico antileucêmico (células P-388 e L-1210) encontrado nos extratos de *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, e *Hyptis capitata*, apresentando ainda efeito inibitório em linhagem celular de carcinoma de pulmão (células A-549) (LEE et al., 1988). O tratamento de ratos com ácido oleanólico na ração (200 ppm) por 3 semanas reduziu a incidência e multiplicidade de neoplasia intestinal induzida por azoximetano (YOSHIMI et al., 1992).

Foi constatada inibição da transformação *in vitro* pelo tratamento com os ácidos oleanólico e ursólico (ITO et al., 1983; OHIGASHI et al., 1986). A ativação do vírus Epstein-Barr (EBV) induzida por TPA em células Raji foi inibida pelos ácidos oleanólico e ursólico (OHIGASHI et al., 1986). A promoção de neoplasias induzidas por 12-o-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA), também foi inibida pelo tratamento com estes triterpenóides (TOKUDA et al., 1986).

Os mecanismos pelos quais os ácidos oleanólico e ursólico inibem o processo neoplásico não são conhecidos, mas sugeriu-se os seguintes efeitos: 1) modulação das defesas do organismo, tais como alterações nos níveis de antioxidantes e funções imunológicas (DOMINIC et al., 1993; KIM et al., 1993, *apud* LIU, 1995); 2) inibição da inflamação produzida por agentes promotores de neoplasias (HUANG et al., 1994; SHIBATA et al., 1994); 3) diminuição da atividade da enzima ornitina descarboxilase em células epiteliais de camundongos tratados com TPA, um promotor de neoplasias (HUANG et al., 1994); 4) supressão da expressão de certos oncogenes, tais como *c-jun* e *c-fos* (RHEW et al., 1993); 5) indução de diferenciação, efeito este que pode ter relação com a remissão parcial de alguns tipos de neoplasias (LEE et al., 1994, *apud* LIU, 1995). Um exemplo disto é a alteração morfológica que estes triterpenóides causam em teratocarcinoma F9, que passam de "stem cells" para células endodérmicas (UMEHARA et al., 1992, *apud* LIU, 1995).

Existem relatos na literatura envolvendo NF- κ B e os ácidos oleanólico e ursólico. Por exemplo, um análogo sintético do ácido ursólico, o ácido 3,11-dioxoolean-1,12-dien-28-óico (TP-72), inibiu a ativação de NF- κ B em macrófagos tratados com interferon-gama e LPS (lipopolissacarídeo bacteriano), conhecidos ativadores de NF- κ B. Este mesmo grupo considerou os ácidos oleanólico e ursólico moléculas interessantes para o estudos de atividade antineoplásica e sugeriram que fossem feitas modificações químicas em suas moléculas com o intuito de melhorar essa atividade (SUH et al., 1998). Por outro lado, o grupo de pesquisadores de Choi (2001) e You (2001) avaliaram os efeitos dos ácidos oleanólico e ursólico na ativação de NF- κ B em macrófagos. Em ambos os casos os triterpenóides aumentaram a ativação de NF- κ B (CHOI et al., 2001; YOU et al., 2001).

Portanto, ainda que os ácidos oleanólico e ursólico sejam recomendados para tratamento do câncer de pele no Japão (MUTO et al., 1990), e estejam presentes em cosméticos que previnem o mesmo tipo de câncer (ISHIDA et al., 1990), além de haver patente nesse país para o uso de ácido oleanólico no tratamento de leucemia não linfóide (LIU, 1986), mais estudos a respeito dos mecanismos de ação dos mesmos são necessários para que se possa elucidar as potencialidades destes triterpenóides como possíveis quimiopreventivos e quimioterápicos do câncer (LIU, 1995).

A hipótese do presente trabalho foi a de que os triterpenóides ácidos oleanólico (AO) e ursólico (AU) apresentariam atividade quimiopreventiva em modelo de hepatocarcinogênese por apresentarem hepatoproteção, atividades anti-inflamatória, quimiopreventiva e quimioterápica. Também esperava-se que essas substâncias diminuíssem a ativação de NF- κ B hepático, contribuindo para uma possível quimioprevenção.

Assim, avaliou-se nesta tese os efeitos dos AO e AU quando administrados a ratos F344 durante as etapas iniciação e seleção/promoção do modelo do RH. Além disso, a investigação de possíveis mecanismos que poderiam estar relacionados com os efeitos desses triterpenóides na hepatocarcinogênese foi realizada através da avaliação da proliferação celular, apoptose, danos no DNA, expressão da enzima HMG-CoA redutase, bem como da avaliação da expressão e ativação do fator de transcrição NF- κ B. Além disso, avaliou-se as proteínas p53 e bcl-2 em cortes histológicos de fígados obtidos no ensaio biológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar os efeitos dos ácidos oleanólico e ursólico, constituintes naturais de alimentos vegetais, ervas medicinais e especiarias, quando administrados continuamente durante oito (8) semanas consecutivas em período compreendendo consecutivamente as etapas de iniciação e promoção inicial, em ratos Fischer (F344) submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” (RH).

2.2 Específicos

- Avaliar os efeitos dos ácidos oleanólico e ursólico sobre as lesões pré-neoplásicas hepáticas dos ratos F344.
- Avaliar a proliferação celular hepática.
- Avaliar a apoptose nos fígados.
- Avaliar a intensidade de danos do DNA hepático.
- Avaliar a ativação do fator de transcrição NF- κ B no tecido hepático.
- Avaliar a expressão da proteína p53 no tecido hepático.
- Avaliar a expressão da proteína Bcl-2 no tecido hepático.
- Avaliar a expressão hepática do gene que codifica para a enzima HMGCoA redutase desses ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Triterpenóides Utilizados no Estudo de Quimioprevenção

Para o estudo de quimioprevenção, utilizou-se os triterpenóides ácido oleanólico, 98,1% de pureza (gentil doação do Dr. J.W. Huang, SAMLONG CHEMICAL CO., LTD.; China) e o ácido ursólico, 90% de pureza (gentil doação dos Drs. Badmaev e Majeed, SABINSA, EUA).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos, albinos, da linhagem Fischer (F344), com pesos iniciais compreendidos entre 60 e 65g e obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/IQ da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (no máximo 4 ratos/gaiola) com tampas de aço inoxidável e contendo maravalha previamente esterilizada, que foi trocada rotineiramente em dias alternados. Estes receberam água filtrada e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Campinas, Brasil), “*ad libitum*”, durante todo o experimento. Seus pesos copróreos foram controlados diariamente até o sacrifício.

Os ensaios biológicos foram realizados nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, em ambiente apropriado para condução de estudos de carcinogênese, com temperatura, luz e umidade ambiental controladas.

3.3 Modelo de Hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”

Os animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do Hepatócito Resistente (RH) receberam por via intraperitoneal, uma única dose (20 mg/100 g de

peso corpóreo) do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA), dissolvido em solução de NaCl a 0,9%.

Após um período de recuperação de 2 semanas os hepatócitos iniciados foram selecionados por meio da administração de 3 doses únicas em dias consecutivos, por intubação gástrica, de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF; Sigma; 2 mg/100 g de peso corpóreo/dia) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e óleo de milho.

Vinte e quatro horas após a última aplicação de 2-AAF os animais foram submetidos a um potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial a 70%.

Finalmente, 4 dias após a intervenção cirúrgica os animais receberam uma dose de 2-AAF (0,5 mg/100 g de peso corpóreo), nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.4 Protocolo Experimental

O protocolo experimental utilizado para avaliar os efeitos dos ácidos ursólico e oleanólico na quimioprevenção da hepatocarcinogênese é mostrado na **Figura 4**. Assim, além dos dois grupos experimentais que receberam separadamente ácido oleanólico (AO) e ácido ursólico (AU), foram utilizados os grupos controle óleo de milho (OM) e o grupo água (Água). Todos os grupos experimentais submetidos ao modelo do RH começaram a ser entubados duas semanas antes da iniciação do referido modelo de hepatocarcinogênese. Os ratos F344 dos grupos AO e AU receberam no presente estudo, por entubação gástrica, ácido oleanólico ou ursólico suspensos em óleo de milho na concentração de 8 mg/0,25 mL de óleo de milho, e administrados na dosagem de 8 mg/100g de rato por dia durante oito semanas consecutivas. Em relação ao grupos controle OM e Água, os mesmos foram entubados com um volume de 0,25 ml das respectivas substâncias por cada 100 g de peso corpóreo.

Figura 4 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação das atividades quimiopreventivas dos ácidos oleanólico e ursólico quando administrados a ratos F344 durante 8 semanas consecutivas e em período abrangendo consecutivamente as etapas de iniciação e promoção inicial do modelo do RH.

Grupo Normal (n=11): ratos F344 não submetidos a qualquer protocolo experimental;

Grupo Água (n=11): grupo entubado com água (0,25 ml/100g de peso corpóreo);

Grupo OM (n=11): grupo entubado com óleo de milho (0,25 ml/100g de peso corpóreo);

Grupo AO (n=11): grupo entubado com ácido oleanólico (8 mg/100g de peso corpóreo, suspenso em óleo de milho);

Grupo AU (n=11): grupo entubado com ácido ursólico (8 mg/100g de peso corpóreo, suspenso em óleo de milho);

DEN (dietilnitrosamina): 20 mg/100g de peso corpóreo;

2-AAF (2-acetilaminofluoreno): 3 doses de 2 mg/100g de peso corpóreo antes da HP e 1 dose de 0,5 mg/100g de peso corpóreo 4 dias após a HP;

HP: hepatectomia parcial a 70%;

S: sacrifício.

3.5 Aplicação da BrDU e Sacrifício dos Animais

Na noite anterior ao sacrifício, foram retiradas as rações para que os animais permanecessem em jejum. Precisamente 2 horas antes do sacrifício de cada animal foi administrada, por via intraperitoneal, uma dose de 5-bromo,2-desoxiuridina (BrDU, Sigma; 10 mg/100 g pc) dissolvida em dimetilsufóxido (DMSO) e solução salina (1:3 v/v), para posterior avaliação da proliferação celular, inclusive dos ratos do grupo Normal.

Antes de serem sacrificados, todos os animais foram pesados em balança eletrônica. Em seguida, os mesmos foram “anestesiados” com éter etílico (Merck, p.a.). Após o início da “anestesia”, os ratos foram colocados em decúbito dorsal sobre uma prancha, com inalação contínua de éter, realizando-se, a seguir, a laparotomia e punção da artéria aorta abdominal.

O sangue coletado foi mantido em tubos de polipropileno contendo 5 mg de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Sigma) e reservado para posterior determinação da concentração plasmática de colesterol total.

O sacrifício se deu pela secção da aorta abdominal e conseqüente choque hipovolêmico. Em seguida, retirou-se o fígado, que foi lavado em solução salina gelada a 0,9% e pesado em balança eletrônica digital seguindo-se, então, o exame macroscópico do mesmo.

3.6 Exame Macroscópico dos Fígados

O fígado de cada animal foi examinado individualmente quanta à presença, em sua superfície, de formações nodulares de tamanhos variados e coloração esbranquiçada, que se distinguiram do parênquima hepático. Esses nódulos macroscópicos, considerados lesões pré-neoplásicas (LPN) (BANNASCH e ZERBAN, 1990) foram classificadas pelo seu diâmetro em “<1 mm”, “1 mm”, “2 mm”, “3 mm”, “4 mm” ou “5 mm”.

Posteriormente, foram colhidas de cada animal amostras dos lobos hepáticos direito, triangular e caudado esquerdo para análise morfométrica de LPN GST-p

positivas, exame histopatológico, avaliação da proliferação celular e apoptose. Esses fragmentos, bem como amostras de duodeno dos animais, foram imediatamente fixados em metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial; Merck p.a.) por aproximadamente 48 horas, sendo, então, submetidos às técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Cortes histológicos de aproximadamente 5 μ m de espessura foram então obtidos.

Do lobo direito foram colhidas amostras para avaliação da proliferação celular, danos no DNA, expressão da enzima HMG-CoA redutase, bem como da expressão e ativação de NF κ B. Esses fragmentos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenados em “freezer” a -80°C (Revco, EUA.).

3.7 Análise morfométrica de LPN hepáticas positivas para a GST-p

A análise morfométrica de LPN (focos/nódulos) foi realizada em cortes histológicos hepáticos submetidos à reação imunoistoquímica para a enzima GST-p.

3.8 Marcação Imunoistoquímica da GST-p

O método utilizado para a realização da marcação imunoistoquímica da GST-p foi o da avidina-biotina (HSU et al., 1981), empregando-se, para tanto, anticorpos policlonais anti-GST-p (Dako, Dinamarca), utilizados na diluição de 1:2000, e, anticorpos secundários biotinilados anti-imunoglobulinas de coelho (Vector Laboratories, California, EUA), na diluição de 1:400. Esses últimos consistem em anticorpos anti-IgG conjugados à biotina.

Cada procedimento foi intercalado por lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fosfato (PBS-[NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e água ultra-pura]).

Os cortes histológicos do material fixado em metacarn foram desparafinizados em xilol em seqüência de xilol/álcool (1:1), etanol absoluto, a 95% e a 70% e, finalmente, água destilada.

A peroxidase endógena foi bloqueada incubando-se as lâminas por 30 min. em metanol (LabSynth, p.a.) contendo 25% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes (LabSynth, p.a.).

Os cortes foram, então, incubados com o anticorpos primário anti-GST-p na diluição de 1:1000, durante uma noite e a 4°C em câmara úmida. Para diluir o anticorpo primário, foi utilizada solução contendo soro-albumina a 5% (albumina bovina fração V; Sigma) em água destilada e azida sódica a 5% (LabSynth, p.a.) em água destilada e PBS.

Em seguida, os cortes foram incubados por 30 min. com o anticorpo secundário biotinilado, na diluição de 1:400.

A aplicação do conjugado avidina-biotina-peroxidase (Vectastain-ABC kit, Vector) diluído em PBS (1:400) decorreu também por 30 min.

Posteriormente, foi aplicada sobre os cortes uma solução substrato de peroxidase preparada imediatamente antes da utilização. Essa solução consistiu na mistura de peróxido de hidrogênio a 0,02% (Merck, p.a.) com diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine; Sigma) a 0,1% em PBS.

Os cortes foram lavados em PBS por 5 min., contracorados pela hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética.

3.9 Procedimento para quantificação de LPN GST-p positivas

Para se quantificar o número e a área das lesões positivas para a GST-p foi utilizado o sistema de análise de imagem computadorizado do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Este é composto por um microscópio (Olympus; Japão) ao qual se encontra acoplada uma câmera de vídeo (Sony, Japão) que se conecta a um microcomputador Pentium 166, equipado com o programa Image Pro Plus (Media Cybernetics). As áreas de interesse foram delimitadas com um cursor e o programa forneceu suas dimensões em mm², após calibração do aparelho.

3.10 Determinação das concentrações hepáticas de DNA

A determinação das concentrações hepáticas de DNA foi realizada utilizando-se o método de Burton (1956) com algumas modificações.

Assim, após pesar 100 mg de fígado, estes foram triturados em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem com 0,6 mL de ácido perclórico (PCA, Merck, p.a.) 1N gelado, e centrifugados (Eppendorf, modelo 5417) a 8000 rpm por 10 min., à temperatura de 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado.

O precipitado foi dissolvido em 1,2 mL de PCA 0,5N gelado. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 10 min., à temperatura de 4° C, desprezando-se o sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais duas vezes.

O precipitado foi, então, ressuspenso em 0,8 mL de PCA 0,5N gelado e mantido em banho (Eppendorf, Thermomixer) a 70° C e com agitação, por uma hora. Decorrido este tempo, a suspensão foi centrifugada por 8000 rpm por 10 min. a 4° C, armazenando-se o sobrenadante.

Para se verificar a concentração de DNA, foram pipetados em tubos de vidro 100 µL de amostra, 900 µL de PCA 0,5 N e 2 mL da solução de difenilamina/acetaldeído que foram, em seguida, armazenados por 17 horas ao abrigo da luz. A leitura foi feita em espectrofotômetro Hitachi (modelo U-3410), no comprimento de onda de 600 nm. A determinação da concentração de DNA foi realizada através da comparação com curva padrão, utilizando-se, para tanto, DNA de timo de vitela (Sigma, código D-1501) como padrão. A solução de difenilamina/acetaldeído utilizada consistiu de 50 µL de solução de difenilamina [750 mg de difenilamina (Sigma), 50 µL de ácido acético glacial (Merck, p.a.) e 750 µL de ácido sulfúrico concentrado (Merck, p.a.)], juntamente com 250 µL da solução de acetaldeído [150 µL de acetaldeído (Fluka Chemica) em 6 mL de água destilada].

3.11 Proliferação Celular

Para realizar-se a avaliação da proliferação celular em cortes histológicos dos fígados dos ratos submetidos ao modelo do RH, discriminado-se LPN persistentes ou em remodelação ou o tecido hepático não pré-neoplásico, utilizou-se o “kit” de **dupla-marcação imunoistoquímica** Dako Double-Stain System. O primeiro anticorpo primário utilizado foi o anticorpo monoclonal anti-BrdU (Amersham Pharmacia Biotech), que marca células na fase S da proliferação celular, sendo a diaminobenzidina o seu substrato cromógeno. O segundo anticorpo primário utilizado foi o anticorpo policlonal anti GST-p (MBL), para a marcação de LPN persistentes ou em remodelação, sendo o Fast Red o seu substrato cromógeno. Após a montagem das lâminas, as mesmas foram lidas em seguida, em microscópio acoplado a sistema de análise de imagens. A leitura das lâminas foi feita varrendo-se toda a extensão dos fragmentos, e o resultado foi expresso como número de células em divisão/mm² de área de LPN persistentes ou em remodelação ou área de tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas.

3.12 Avaliação da Apoptose

Para a avaliação da apoptose em cortes histológicos de fígado de rato empregou-se método de microscopia de fluorescência descrito por Stinchcombe et al. (1995). Este se baseia na observação de que corpúsculos apoptóticos (CA) apresentam intensa fluorescência da eosina em cortes histológicos de fígado corados com H&E e submetidos à luz em comprimento de onda entre 460 e 480 nm. Assim, utilizou-se microscópio de epifluorescência (Nikon, Japão) (Laboratório de Imunologia Clínica, FCF-USP) para quantificar o número de CA tanto nas áreas de tecido não pré-neoplásico ao redor das LPN como nas próprias. A área total dos cortes histológicos foi analisada utilizando-se objetiva de 20X e a medida em que se localizavam os corpúsculos fluorescentes, alternava-se o sistema para luz transmitida normal e suas identidades eram, então, confirmadas de acordo com critérios morfológicos clássicos descritos na literatura (GRASL-KRAUPP et al.,

1994). Os resultados foram expressos como o número de CA/mm² de área de LPN ou área de tecido não pré-neoplásico ao redor da mesma.

3.13 Imunoistoquímica de p53 e bcl-2

Para a marcação com os anticorpos anti-p53 ou anti-bcl-2, utilizou-se o kit de marcação ImmunoCruz™ Staining Systems (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, anticorpos e kit), segundo manual do fabricante. Resumidamente, foi bloqueada a peroxidase e, em seguida, as lâminas foram incubadas por 20 minutos em soro de bloqueio. Em seguida, foram incubadas com os anticorpos primários diluídos, anti-p53 ou anti-bcl-2, sendo ambos diluídos na concentração de 1:100, e incubados por 2 horas. Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em anticorpo secundário biotinilado, sendo posteriormente incubadas em complexo HRP(Horse Radish Peroxidase)-streptavidina. A coloração foi desenvolvida com o substrato de HRP. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas em Permount™.

A especificidade das marcações foi controlada subtraindo-se o anticorpo primário ou substituindo-o por soro de cabra não imunizada, para ambos os ensaios, de p53 ou de bcl-2. Em todos os casos isto resultou em ausência de marcação. A reprodutibilidade dos métodos foi checada marcando-se mais de uma lâmina de um mesmo animal, obtendo-se resultados consistentes. Além disso, utilizou-se lâmina de controle positivo de marcação para p53, carcinoma de célula escamosa (DakoCytomation, Carpinteria), gentilmente doada pela Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, na qual foi comprovada a eficácia e a especificidade da metodologia empregada para a marcação de p53 (**Figura 18**).

3.14 Preparação do Extrato Protéico de Fígado

Para a preparação do extrato protéico total de amostras de fígado dos ratos submetidos ao modelo do RH (ensaio piloto), foi utilizado o reagente para extração

de proteína de tecido T-PER™ (Pierce, Rockford). A esse reagente foi adicionado um inibidor de protease, PMSF™ (Sigma), na concentração de 1 mg/mL e sódio dodecil sulfato (SDS) para uma concentração final de 5%. Após fervura de 10 minutos as amostras foram então congeladas a -78° C, para posterior quantificação da concentração de proteínas, que foi realizada utilizando-se o método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay).

3.15 Preparação do Extrato Protéico Nuclear

Para a obtenção de extratos protéicos de frações celulares nuclear e citoplasmática, utilizou-se o “kit” de extração citoplásmica e nuclear NE-PER® (Pierce, EUA), segundo o manual de instruções do fabricante. Basicamente, pesou-se exatamente cerca de 50 mg de tecido hepático recolhido por ocasião do sacrifício dos ratos submetidos ao modelo experimental, obtendo-se ao final do processo as frações nuclear e citoplasmática.

Para quantificação da concentração de proteínas, foi utilizado o método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay).

3.16 Western Blotting

Os extratos de proteína total, nuclear e citoplasmática foram separadamente submetidos a eletroforese de gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), em gel a 10% e tampão Tris-glicina 1X (Método de Laemmli), utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (Hoefer mini VE Electrophoresis System). As proteínas foram então transferidas do gel para membrana de nitrocelulose.

O bloqueio das membranas de nitrocelulose foi feito com PBS contendo 5% de leite em pó ou 3% de albumina bovina sérica, durante uma noite a 4° C. As membranas foram então incubadas com o anticorpo primário anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000), diluído em tampão PBS, por duas horas em temperatura

ambiente. A membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP), e a imunodeteção foi feita utilizando-se o sistema de quimioluminescência ECL (Amersham Pharmacia Biotech). A membrana foi exposta a filme de raio-X (Kodak X-Omat) para o desenvolvimento das bandas.

Foram realizados dois ensaios independentes de "imunoblotting" com diferentes amostras de extratos protéicos (nucleares, citoplasmáticos e totais), perfazendo um total de 4 amostras de fígado de ratos normais (não submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese ou a qualquer outro tratamento) e 6 amostras de fígado de cada grupo de ratos submetidos ao protocolo do "hepatócito resistente", a saber, dos grupos Água, OM, AO e AU. Obtivemos, portanto, um "n" de 6 animais para cada grupo, e de 4 para o grupo controle Normal.

Para se quantificar as intensidades das bandas, utilizou-se um densitômetro BIO-RAD (Modelo GS-700 Imaging Densitometer) com software específico (Molecular Analyst). Os sinais foram quantificados em unidades arbitrárias. A membrana foi corada com corante de comassie (Comassie Blue, Pierce, Rockford), e os dados foram normalizados utilizando-se o sinal correspondente deste corante para corrigir as variações no carregamento das proteínas.

Os valores de unidades densitométricas arbitrárias assim obtidos foram expressos em relação ao grupo Normal, sendo o mesmo considerado igual a 1.

3.17 Avaliação da Expressão do Gene que codifica para a Enzima HMGCoA redutase pelo Método de "Dot blot"

A avaliação da expressão do gene que codifica para a enzima HMGCoA redutase foi realizada através da técnica de "Dot Blot", utilizando-se amostras de fígado obtidas por ocasião do sacrifício dos ratos F344.

Para a extração de RNA total de tecidos hepáticos utilizou-se reagente específico para essa finalidade e de marca Trizol[™] (Gibco, EUA). Assim, foram pesados 500 mg de amostra de fígado, ao qual se adicionou 5 mL de reagente Trizol[™]. Incubou-se a amostra por 5 minutos, a 30°C e, em seguida, se adicionou 1 mL de clorofórmio (Sigma, EUA). A amostra foi então agitada em agitador tipo "vortex" e centrifugada a 9.000 g por 15 minutos e a 4°C. A fase aquosa foi

transferida para tubo autoclavado, adicionando-se 2,5 mL de isopropanol (Sigma, EUA). O RNA total foi precipitado durante uma noite e a -20°C e coletado por meio de centrifugação a 9.000 g, por 10 minutos e a 4°C . O sobrenadante foi removido e o “pellet” lavado com etanol a 75%. O RNA total obtido foi dissolvido em 400 μL de SDS a 0,5%.

Para a realização da técnica de “Dot Blot” utilizou-se basicamente metodologia descrita por Sambrook e Russel (2002). Assim, 75 μg de RNA total de cada amostra foram transferidos para membrana de nylon (Hybond XL, Amersham Biosciences, EUA) utilizando-se para tanto aparato específico para análise de “Dot Blot” (Bio Rad, EUA) acoplado à bomba de vácuo. O RNA total transferido para a membrana foi fixado em unidade UV Crosslinker (Hoefer, EUA), aplicando-se 120.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de área.

A membrana contendo as amostras de RNA total foi submetida à pré-hibridização em solução contendo formamida, SSC, ficoll, polivinilpirrolidona, albumina bovina fração V, SDS e DNA de esperma de salmão. A pré-hibridização foi conduzida por 4 horas e a 42°C em forno de hibridização (Amersham Biosciences, Inglaterra). Em seguida, adicionou-se a solução de pré-hibridização sonda de cDNA para HMGC CoA redutase previamente marcada com fósforo radioativo pelo método de “random priming”. A sonda do gene que codifica para a enzima HMGC CoA redutase foi o cDNA de inserido de hamster para HMGC CoA redutase, isolado do plasmídeo (Pred 227. ATCC) (MORENO et al., 1995). A hibridização ocorreu também a 42°C durante 16 horas. A membrana foi lavada em solução contendo SSC e SDS. A membrana foi acondicionada juntamente com filme de raio-X, X-OMAT-K (Eastman Kodak Co., New York, EUA) em chassi radiográfico (Ecran intensificador de imagem, base verde; Konex, Brasil) por cerca de 4 dias e o filme, então, revelado.

O sinais identificados por auto-radiografia, correspondentes às áreas da membrana hibridizadas com a sonda de cDNA, foram analisados em sistema de análise densitométrica (Bio Rad, EUA). Como controle de aplicação das amostras de RNA total, corou-se a membrana com azul de metileno.

3.18 Determinação das Concentrações de Colesterol Plasmático Total

Utilizou-se o “kit” enzimático-espectrofotométrico para a determinação de colesterol total (BioSystems, Espanha) nas amostras de plasma obtidas por ocasião do sacrifício dos animais. Este se baseia em reações enzimáticas em que o colesterol presente na amostra (esterificado e não-esterificado) é oxidado, produzindo-se, em última instância, um complexo colorido quantificável espectrofotometricamente. O procedimento utilizado foi o indicado pelo fabricante: 10 µL de amostra de plasma foram adicionados a 1 mL do reagente fornecido com o “kit”. A solução foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente durante 10 min. Decorrido esse tempo, realizou-se leitura espectrofotométrica (U 3410, Hitachi, Japão) das amostras a 500 nm. As absorbâncias das amostras de plasma foram comparadas a de uma amostra padrão de colesterol (200 mg/dL), que também foi fornecida juntamente com o “kit”. De todos os valores de absorbância descontou-se a leitura do branco (1 ml de reagente, sem a adição de amostra ou padrão). Todas as determinações de colesterol total foram realizadas em triplicata.

3.19 Avaliação de danos no DNA hepático

A avaliação de danos no DNA hepático em amostras de fígado previamente armazenadas a -78°C foi realizada com modificações, utilizando-se basicamente o método do “cometa”, conforme descrito por SINGH et al. (1988). Assim, os tecidos hepáticos (50mg) foram homogeneizados delicadamente em PBS (KCl, Na₂HPO₄; KH₂PO₄, NaCl, pH 7,6) sob refrigeração em gelo. As células isoladas foram, então, imobilizadas em matriz de agarose de baixo ponto de fusão “low-melting” (Sigma, USA) a 0,08% em PBS sobre lâmina de vidro previamente tratada com agarose “low-melting” a 0,05%. Posteriormente, as células imobilizadas foram lisadas durante 1 hora ao abrigo da luz em solução de lise (NaCl 2,5 M; Trizma base 10 mM; Na₂-EDTA, 100 mM; N-laurilsarcosina a 1%; pH 10,0 e adição, a seguir, de Triton X-100 a 1%) e submetidas a uma lavagem com a mesma solução de eletroforese. A eletroforese (NaOH 300 mM e 1 mM de Na₂-EDTA, pH acima de 13,0; a 25 V, por 40 minutos) foi precedida de etapa de “unwinding” do DNA por 20 minutos ao abrigo

da luz. A seguir, realizou-se lavagem das lâminas com solução de Tris 0,4M, pH 7,5. Os cometas resultantes foram fixados em solução de ácido tricloroacético a 15% e corados com nitrato de prata a 0,02%. Células provenientes de tecidos hepáticos de ratos normais tratados ou não com peróxido de hidrogênio (concentração final 10%, 5 minutos, à temperatura ambiente e sob sonicação) foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

O comprimento dos cometas foi avaliado utilizando-se sistema de análise de imagem computadorizada, composto por um microscópio (Olympus; Japão,) com câmera de vídeo (Sony, Japão) acoplada que se conecta a um microcomputador Pentium 166, equipado com o programa Image Pro Plus (Media Cybernetics). Foram analisados aleatoriamente 50 cometas em cada lâmina, perfazendo 100 cometas por animal (TOLEDO et al., 2003).

3.20 Análise Estatística

Para a realização da análise estatística utilizou-se o programa SigmaStat (Jandel Scientific). Utilizou-se o teste t de Student pareado ou não pareado, de acordo com a necessidade de cada análise (LEVIN, 1985). Em todos os casos, o nível de confiança utilizado foi de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Crescimento dos Animais

Com o intuito de controlar possíveis respostas tóxicas por parte dos ácidos oleanólico ou ursólico durante o protocolo de hepatocarcinogênese, bem como a aplicação adequada do modelo do RH, o ganho de peso dos animais foi acompanhado diariamente durante as 8 semanas de duração do experimento.

O resultado desse acompanhamento pode ser visto na **Figura 5**. Nota-se nessa **Figura 5** a perda de peso dos animais que receberam a dose única do agente iniciante DEN em relação aos animais do grupo controle (grupo Normal). Também é perceptível uma relativa estabilização dos pesos dos ratos durante as primeiras entubações gástricas com o agente mitoinibitório 2-AAF e, por fim, a perda considerável e esperada de peso devida à hepatectomia parcial. Neste período, após a hepatectomia parcial, quatro animais do grupo AO morreram. Também houve uma morte no grupo AO e uma no grupo Água.

Os animais considerados “normais”, e que não foram submetidos ao modelo mencionado, mas que apenas permaneceram nas mesmas condições que os demais (temperatura constante de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo luz-escuro de 12 horas), apresentaram um ganho de peso mais pronunciado quando comparados aos animais dos demais grupos.

O consumo médio de ração por parte dos animais submetidos ao experimento foi: Grupo Normal, $9,6 \pm 2,2$ g; Grupo Água, $9,1 \pm 2,9$ g; Grupo OM, $8,7 \pm 2,8$ g; Grupo AO, $8,7 \pm 2,9$ g; Grupo AU, $8,7 \pm 2,9$ g. Portanto, não houve diferença na média de consumo de ração entre os grupo AO e AU e seu controle OM.

Figura 5. Curva de peso corpóreo de ratos F344 tratados com os ácidos oleanólico e ursólico, ou simplesmente com óleo de milho ou água (controles), e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

As abreviações são: DEN= dietilnitrosamina; 2-AAF= 2-acetilaminofluoreno; HP= hepatectomia parcial a 70%; AO= ácido oleanólico;

AU= ácido ursólico.

Na **Tabela 1** a seguir pode-se observar os resultados referentes aos pesos iniciais e finais médios dos animais de cada grupo experimental. Além disso, são apresentados os pesos médios e os pesos relativos (peso relativo do fígado por cada 100 g de animal) dos fígados dos animais constatados por ocasião do sacrifício.

Tabela 1 - Pesos corpóreos inicial e final, bem como peso relativo do fígado de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

Grupos	Peso Corpóreo Inicial (g) [n]	Peso corpóreo final (g) [n]	Peso do Fígado (g) [n]	Peso relativo do fígado/100 g de peso do rato [n]
Normal	63,1 ± 4,3 [11]	281,9 ± 20,4 [11]	8,3 ± 1,0 [11]	2,9 ± 0,19 [11]
Água	62,4 ± 3,3 [11]	235,8 ± 17,2 ^a [10]	7,8 ± 1,6 ^a [10]	3,3 ± 0,60 ^a [10]
OM	61,6 ± 4,0 [11]	232,0 ± 18,1 ^a [11]	7,5 ± 0,9 ^a [11]	3,2 ± 0,22 ^a [11]
AO	62,6 ± 4,0 [11]	229,5 ± 25,0 ^a [6]	6,9 ± 0,6 ^{a,b} [6]	3,0 ± 0,12 ^b [6]
AU	62,2 ± 5,3 [11]	227,2 ± 15,8 ^a [10]	7,8 ± 1,5 [10]	3,4 ± 0,78 ^a [10]

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento;

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água;

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho;

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico;

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico.

[n]= número de animais no grupo.

Os valores são respectivamente média ± desvio padrão.

^adiferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de Student não pareado ($p < 0,05$) em relação ao grupo Normal.

^bdiferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de Student não pareado ($p < 0,05$) em relação ao grupo OM.

Dessa forma, é possível se verificar na **Tabela 1** que os pesos iniciais e finais dos diferentes grupos submetidos ao modelo do RH foram semelhantes. Os grupos submetidos ao modelo do RH apresentaram pesos corpóreos finais menores do que o apresentado pelo grupo Normal ($p < 0.05$).

Considerando-se os pesos relativos dos fígados, observa-se que os grupos Água, OM e AU têm pesos relativos de fígado maiores do que o do grupo Normal (p

< 0,05). O grupo AO apresenta peso relativo de fígado menor do que o encontrado no grupo OM ($p < 0,05$). Além disso, o grupo AO apresenta uma tendência de diferença no peso relativo do fígado quando comparado ao grupo AU ($p < 0,062$).

Também observa-se que os grupos Água, OM e AU apresentam peso relativo do fígado maior do que o encontrado no grupo Normal ($p < 0,05$). O grupo AO, por sua vez, não apresenta diferença significativa no peso relativo do fígado quando comparado ao grupo Normal, mas este peso é estatisticamente menor do que o observado em seu grupo controle OM. O grupo AO também apresenta uma tendência de diferença de peso relativo de fígado quando comparado ao grupo AU ($p < 0,06$).

4.2 Quantificação de LPN Macroscopicamente Visíveis nos Fígados

Logo após o sacrifício dos animais, foram contados os nódulos de hepatócitos (lesões pré-neoplásicas visíveis à macroscopia) presentes à superfície (**Figura 6**) e ao corte em fatias de aproximadamente 3 mm, de cada lobo hepático. Além disso, foram estimadas as suas dimensões.

Os resultados observados em relação ao exame macroscópico do fígado dos ratos dos diversos grupos experimentais encontram-se apresentados nas **Tabelas 2 e 3** a seguir.

Tabela 2 - Incidência e número de nódulos hepáticos macroscopicamente visíveis de ratos da linhagem F344 normais e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

Grupo	Número de ratos com nódulos/número total de ratos	Incidência de nódulos (%)	Total de nódulos	Número total de nódulos/ Número de ratos com nódulos (multiplicidade)
Água	10/10	100%	704	70,4 ± 62,0
OM	11/11	100%	663	60,2 ± 30,9
AO	6/6	100%	396	66,0 ± 65,0
AU	10/10	100%	1009	100,9 ± 71,2

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento;

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água;

Óleo= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho;

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico;

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico.

Os valores de multiplicidade são respectivamente média ± desvio padrão.

Verifica-se pela **Tabela 2** que o modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” promoveu a incidência de nódulos de hepatócitos em 100% dos grupos a ele submetidos. Observa-se que a multiplicidade de nódulos presentes no grupo AU é maior do que a multiplicidade observada no grupo controle OM, porém não há significância estatística.

Segundo pode ser observado na **Tabela 3**, a maior parte dos nódulos observáveis à macroscopia nos ratos F344 dos grupos Água, OM, AO e AU e submetidos ao modelo do RH apresentavam entre <1mm e 1mm de dimensão. Menos de 1% dos nódulos apresentavam dimensões maiores do que 4 mm. Não há diferenças consideráveis em relação aos tamanhos dos nódulos entre os grupos experimentais submetidos ao modelo do RH.

Tabela 3 – Porcentagens de nódulos hepáticos macroscopicamente visíveis e com dimensões de <1, 1, 2, 3, 4 e 5 mm, de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

Grupo	Porcentagem de nódulos em relação ao tamanho (mm)					
	< 1	1	2	3	4	5
Água	40,1%	46,4%	12,1%	1,0%	0,4%	0%
OM	70,3%	24,9%	4,1%	0,4%	0,1%	0,1%
AO	59,8%	33,8%	6,1%	0%	0%	0,2%
AU	43,0%	29,9%	25,2%	1,5%	0,2%	0,2%

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento;

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água;

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho;

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico;

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico.

Figura 6 - Lesões pré-neoplásicas macroscópicas em fígado de rato da linhagem F344 (grupo OM) submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. As setas indicam nódulos de hepatócitos na superfície.

4.3 Quantificação de LPN (Focos e Nódulos de Hepatócitos) GST-p Positivas

Baseando-se em critérios previamente publicados (FARBER *et al.* 1988; OHASHI *et al.*, 1996), decidiu-se no presente estudo por procurar classificar as LPN totais (focos/nódulos de hepatócitos) positivas para GST-p, como sendo persistentes (Figura 7) ou em remodelação (Figura 8).

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam os resultados da análise morfométrica das LPN marcadas imunoistoquimicamente para a enzima GST-p, em fígados de ratos F344 entubados com água (grupo Água), óleo de milho (grupo controle OM), ácido oleanólico (AO) e ácido ursólico (AU), e submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH).

Tabela 4 - Número médio de LPN (totais, persistentes e em remodelação) GST-p positivas por cm² de tecido hepático, dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

GRUPOS	n	Número médio de LPN Totais (Persistentes +Remodelação)/cm ²	Número médio de LPN Persistentes/cm ²	Número médio de LPN em Remodelação/cm ²
ÁGUA	10	58,25 ± 17,59	32,33 ± 11,35	25,91 ± 9,24
OM	11	80,59 ± 19,02 ^a	36,86 ± 8,40	43,72 ± 13,42 ^a
AO	6	66,19 ± 18,03	38,62 ± 13,37	27,56 ± 8,28 ^b
AU	9	70,76 ± 15,66	39,12 ± 10,70	31,63 ± 11,64 ^b

LPN= lesões pré-neoplásicas;

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento;

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água;

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho;

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico;

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico.

Os valores se referem a média ± desvio padrão. n= número de animais.

^adiferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de Student não pareado (p < 0,05) em relação ao grupo Água;

^bdiferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de Student não pareado (p < 0,05) em relação ao grupo OM.

Como mostra a Tabela 4, os grupos AO e AU não apresentam diferença estatisticamente significativa em relação ao número médio de LPN hepáticas totais

GST-p positivas (focos e nódulos de hepatócitos persistentes e em remodelação), quando comparados ao grupo entubado com óleo de milho (grupo controle OM). O grupo OM, ao contrário, apresentou um número significativamente maior de LPN GST-p positivas totais quando comparado ao grupo Água ($p < 0,05$).

Em relação às LPN persistentes, não se observou diferenças estatisticamente significantes no número médio dessas lesões entre os grupos.

O grupo OM apresentou maior número médio de LPN em remodelação quando comparado ao grupo Água ($p < 0,05$). Nos grupos AO e AU observou-se um menor número médio de LPN em remodelação quando comparados ao grupo controle OM ($p < 0,05$).

Figura 7 - Digitalização de lâmina com corte histológico de fígado de rato F-344 tratado durante 8 semanas consecutivas com óleo de milho (grupo OM) e submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. Verificar imunomarcação pela GSTP em foco de hepatócito considerado como “persistente” (observar bordas definidas e coloração homogênea). Objetiva de 10X.

Figura 8 - Digitalização de lâmina com corte histológico de fígado de rato F-344 tratado durante 8 semanas consecutivas com óleo de milho (grupo OM) e submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do “RH”. Verificar imunomarcação pela GSTP em foco de hepatócito considerado como “em remodelação” (observar bordas irregulares e coloração heterogênea no interior do foco). Objetiva de 10X.

Tabela 5 - Área média (mm²) de LPN (totais, persistentes e em remodelação) GST-p positivas, dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

GRUPOS n		Área média de LPN Totais (mm ²)	Área média de LPN Persistentes (mm ²)	Área média de LPN em Remodelação (mm ²)
ÁGUA	10	0,63 ± 0,37	0,90 ± 0,52 ^a	0,25 ± 0,11
OM	11	0,60 ± 0,32	0,97 ± 0,55 ^a	0,28 ± 0,13
AO	6	0,45 ± 0,23	0,95 ± 0,52 ^a	0,18 ± 0,07 ^b
AU	9	0,62 ± 0,47	0,96 ± 0,66 ^a	0,18 ± 0,14 ^b

LPN= lesões pré-neoplásicas;

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento;

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água;

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho;

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico;

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico.

Área média ± desvio padrão das LPN GST-p positivas.

n= número de animais.

^adiferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de Student pareado (p < 0,05) quando comparado às LPN em remodelação;

^bdiferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de Student não pareado (p < 0,05) quando comparado ao grupo OM;

Observa-se na **Tabela 5** que a área média das LPN GST-p positivas persistentes foi maior em todos os grupos quando comparadas às áreas médias das LPN em remodelação (p < 0,05). Nos grupos AO e AU, a área média das LPN em remodelação foi menor do que aquela observada no grupo OM (p < 0,05).

Tabela 6 - Porcentagem da área do corte de tecido hepático ocupada por LPN (totais, persistentes e em remodelação) GST-p positivas, dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

GRUPOS n		% Área do corte ocupada por LPN Totais	% Área do corte ocupada por LPN Persistentes	% Área do corte ocupada por LPN em Remodelação
ÁGUA	10	38,26 ± 26,48	32,25 ± 25,14 ^a	6,18 ± 2,88
OM	11	48,49 ± 25,50	35,72 ± 21,66 ^a	12,84 ± 6,38 ^b
AO	6	31,19 ± 22,91	36,91 ± 20,87 ^a	4,86 ± 2,05 ^c
AU	9	41,51 ± 29,29	34,17 ± 27,85 ^a	7,76 ± 5,16 ^c

LPN= lesões pré-neoplásicas;

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento;

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água;

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho;

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico;

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico.

Os valores se referem a média ± desvio padrão. n= número de animais.

^adiferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de student pareado ($p < 0,05$) quando comparado ao valor da % da área do corte ocupada por LPN em remodelação;

^bdiferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de student não pareado ($p < 0,05$) quando comparado ao valor da % da área do corte ocupada por LPN em remodelação do grupo Água.

^cdiferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de student não pareado ($p < 0,05$) quando comparado ao valor da % da área do corte ocupada por LPN em remodelação do grupo OM.

Observa-se na **Tabela 6** que a porcentagem da área do corte ocupada por LPN persistentes GST-p positivas esteve maior em todos os grupos quando comparada às porcentagens da área do corte ocupadas por LPN em remodelação ($p < 0,05$).

O grupo OM apresentou maior porcentagem de área de corte ocupada por LPN GST-p positivas em remodelação quando comparado ao grupo Água ($p < 0,05$).

Já nos grupos AO e AU, observa-se uma menor porcentagem de área de corte ocupada por LPN GST-p positivas em remodelação quando comparados ao seu grupo controle OM ($p < 0,05$).

4.4 Concentração Plasmática de Colesterol Total

Por ocasião do sacrifício dos animais submetidos ao Protocolo Experimental uma amostra de sangue dos mesmos foi colhida, visando-se avaliar a concentração plasmática de colesterol total (mg/dL). Foi determinada a concentração de colesterol total nas amostras de sangue, e os resultados são mostrados na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Concentração plasmática de colesterol total (mg/dL) de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

Grupo	Normal	Água	OM	AO	AU
Média	59,0 ± 10,1	70,9 ± 10,3 ^a	71,5 ± 12,0 ^a	64,1 ± 19,0	70,1 ± 9,8 ^a

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento;

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água;

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho;

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico;

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico.

Os valores se referem a média ± desvio padrão.

^adiferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de Student não pareado ($p < 0,05$) quando comparado grupo Normal.

Pode-se observar na **Tabela 7** que os grupos Água, OM e AU apresentaram concentrações plasmáticas de colesterol total mais elevadas do que a observada no grupo Normal ($p < 0,05$). O grupo AO não apresentou diferença estatística da concentração plasmática de colesterol em relação ao grupo Normal, porém não foi observada diferença estatística em relação ao grupo controle OM.

Também não se observou diferenças estatisticamente significantes entre concentrações plasmáticas de colesterol total nos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo do RH.

4.5 Avaliação da Expressão do Gene que Codifica para a Enzima HMG-CoA Redutase

Para a avaliação da expressão do gene que codifica para a enzima HMG-CoA redutase nos grupos experimentais, foi extraído o RNA total de amostras de fígado obtidas por ocasião do ensaio biológico. Esse RNA foi submetido à análise pela técnica de "dot blot", e os resultados assim obtidos são mostrados na **Figura 9**.

Como pode ser observado na **Figura 9**, a expressão do gene da enzima HMG-CoA redutase esteve aumentado nos grupos AO e AU quando comparados ao grupo Normal ($p < 0,05$). Dentre os grupos tratados com os triterpenóides, apenas no grupo AU observa-se um aumento da expressão do gene de HMG-CoA redutase em relação ao grupo OM ($p < 0,05$). A expressão desse gene esteve também aumentado no grupo AU quando comparado aos grupos Água e AO ($p < 0,05$).

Tanto o grupo Água quanto o grupo OM apresentaram um aumento de expressão do gene que codifica para a HMG-CoA redutase com uma tendência de diferença estatística quando comparados ao grupo Normal, com valores de $p = 0,055$ e $p = 0,077$, respectivamente.

Figura 9 – Expressão do gene que codifica para a enzima HMG-CoA redutase avaliada por “dot blot” em fígado de ratos F344 submetidos ao Protocolo Experimental (**Figura 4**). Os valores (média $\pm$ desvio padrão) estão expressos em unidades densitométricas arbitrárias do grupo Normal e dos grupos submetidos ao modelo do “RH”.

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento (n = 6);

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água (n = 6);

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho (n = 6);

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico (n = 6);

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico (n = 6).

^adiferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo Normal ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student.

^bdiferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo OM ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student.

^cdiferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo Água ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student.

^ddiferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo AO ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student.

4.6 Concentração de DNA Determinada pelo Método de Burton

Amostras de fígados dos ratos submetidos ao modelo do RH e dos grupos experimentais foram utilizadas para a determinação de concentração de DNA pelo método de Burton, e os resultados são mostrados na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Concentração média e desvio padrão de DNA em mg/100g de tecido hepático de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

Grupo	Normal	Água	OM	AO	AU
Média	1,49 ± 0,27	1,90 ± 0,38 ^a	2,15 ± 0,32 ^a	2,01 ± 0,67 ^a	2,22 ± 0,39 ^a

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento (n= 11);

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água (n= 10);

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho (n= 11);

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico (n= 6);

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico (n= 9).

Os valores se referem a média ± desvio padrão.

^adiferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de Student não pareado (p< 0,05) quando comparado ao grupo Normal.

Basicamente, nota-se que há um aumento da concentração de DNA nos grupos experimentais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH se comparados ao grupo Normal (p < 0,05).

4.7 Contagem de Hepatócitos Marcados Imunoistoquimicamente para BrdU

Por meio de dupla-marcação imunoistoquímica de BrdU e GST-p, foi feita a contagem de hepatócitos marcados para BrdU nos grupos experimentais submetidos ao modelo do RH, discriminando-se as áreas de tecido não pré-neoplásico, LPN persistentes e em remodelação. Também foi feita a contagem de hepatócitos

marcados imunoistoquimicamente para BrdU nos animais do grupo Normal. A **Figura 10** ilustra a dupla-marcação imunoistoquímica de BrdU e GST-p, e os dados obtidos com a contagem de hepatócitos marcados para BrdU são mostrados na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Número médio de hepatócitos imunoistoquimicamente marcados para BrdU por mm² de corte histológico de fígado de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH, discriminando-se tecido não pré-neoplásico, LPN persistentes e em remodelação.

Grupos (n)	Tecido não pré-neoplásico	LPN Totais	LPN Persistentes	LPN em Remodelação	Tecido normal
Normal (11)	-	-	-	-	1,58 ± 0,92
Água (10)	2,10 ± 2,14	1,99 ± 0,81 ^b	2,25 ± 1,04 ^b	1,32 ± 0,74	-
OM (9)	1,35 ± 0,70	0,83 ± 0,52 ^{a,c}	1,01 ± 0,72 ^{b,c}	0,50 ± 0,47 ^{a,c}	-
AO (4)	1,31 ± 0,54	1,27 ± 0,44	1,35 ± 0,47	0,97 ± 0,53	-
AU (8)	1,19 ± 1,21	1,51 ± 1,40	1,56 ± 1,51	1,51 ± 1,25 ^d	-

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento;

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água;

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho;

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico;

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico.

Os valores se referem a média ± desvio padrão.

n= número animais utilizados para a análise.

^adiferença estatisticamente significativa quando comparado ao tecido não pré-neoplásico do mesmo grupo, de acordo com o teste t de Student pareado (p < 0,05);

^bdiferença estatisticamente significativa quando comparado às LPN em remodelação, de acordo com o teste t de Student pareado (p < 0,05);

^cdiferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Água, de acordo com o teste t de Student não pareado (p < 0,05);

^ddiferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo OM, de acordo com o teste t de Student não pareado (p < 0,05);

Considerando-se cada grupo separadamente, como pode ser observado na **Tabela 9**, o grupo Água apresenta mais imunomarcagem de BrdU em LPN persistentes quando comparadas às LPN em remodelação (p < 0,05).

O mesmo pode ser observado no grupo OM, onde há menor imunomarcção de BrdU nas LPN em remodelação, se comparadas às LPN persistentes ($p < 0,05$). Além disso, ainda nesse grupo, as LPN em remodelação apresentaram menos núcleos de hepatócitos marcados para BrdU quando comparadas ao tecido não pré-neoplásico ($p < 0,05$).

O grupo AO não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre a imunomarcção de tecido não pré-neoplásico, LPN totais, persistentes ou em remodelação.

Da mesma maneira, no grupo AU não se observam diferenças estatisticamente significantes entre tecido não pré-neoplásico, LPN totais, persistentes ou em remodelação.

Na comparação entre grupos, observa-se que o grupo OM apresentou menor número de hepatócitos marcados para BrdU nas LPN totais, nas persistentes e nas em remodelação quando comparado ao grupo Água ($p < 0,05$). O tecido não pré-neoplásico do grupo OM, no entanto, não apresentou diferença na imunomarcção de BrdU ao ser comparado ao tecido não pré-neoplásico grupo Água.

Comparando-se o grupo AO com seu respectivo controle OM, nota-se que não há diferenças significantes entre o número de hepatócitos marcados para BrdU, tanto no tecido não pré-neoplásico quando nas LPN totais, persistentes e em remodelação.

Em relação ao grupo AU, entretanto, ao ser comparado com o grupo OM, observa-se um maior número de hepatócitos marcados para BrdU nas LPN em remodelação ($p < 0,05$).

Figura 10 - Digitalização de lâmina de corte histológico de fígado de rato F344 tratado durante 8 semanas consecutivas com óleo de milho (grupo OM, controle) e submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”. Verificar dupla-marcação imunoistoquímica para LPN GST-p positiva (área avermelhada) e para BrdU (núcleos indicados pelas setas, fora e dentro de uma LPN). Objetiva de 40X.

4.8 Contagem de Corpúsculos Apoptóticos

Para a contagem do número de corpúsculos apoptóticos foi utilizado o método de fluorescência de eosina, descrito no item Material e Métodos, no qual os corpúsculos apoptóticos tornam-se fluorescentes, como ilustrado na **Figura 11**. A **Tabela 10** apresenta os dados referentes à quantificação de corpúsculos apoptóticos hepáticos do grupo Normal, bem como das áreas não pré-neoplásicas ao redor das LPN, e das próprias LPN (persistentes ou em remodelação) de ratos F344 dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

Tabela 10 - Quantificação de corpúsculos apoptóticos hepáticos (número/mm²) de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e de tecido não pré-neoplásico ao redor das LPN (focos e nódulos de hepatócitos), e das próprias LPN, sejam elas totais, persistentes ou em remodelação dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

Grupos (n)	Tecido não pré-neoplásico	LPN Totais	LPN Persistentes	LPN em Remodelação	Tecido Normal
Normal (10)	-	-	-	-	0,54 ± 0,40
Água (10)	0,75 ± 0,3	1,69 ± 1,7 ^e	1,24 ± 1,0 ^{a,e}	2,18 ± 1,4 ^{a,c,e}	-
OM (11)	0,79 ± 0,8	0,79 ± 0,9	0,68 ± 0,9	1,49 ± 2,3	-
AO (6)	0,71 ± 0,3	1,19 ± 1,2 ^d	0,91 ± 0,9	3,12 ± 2,9 ^{a,b,c,e}	-
AU (8)	0,71 ± 0,5	1,14 ± 0,7 ^e	0,99 ± 0,7	2,56 ± 2,8 ^{a,c,e}	-

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento;

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água;

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho;

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico;

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico;

n= número de animais, os valores se referem a média ± desvio-padrão.

^adiferença estatisticamente significativa em comparação ao tecido não pré-neoplásico (p < 0,05), de acordo com o teste t de Student pareado.

^bdiferença estatisticamente significativa em comparação com as LPN persistentes (p < 0,05), de acordo com o teste t de Student pareado.

^cdiferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo OM (p < 0,05), de acordo com o teste t de Student não pareado.

^ddiferença estatisticamente significativa em comparação com LPN em remodelação ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student pareado.

^ediferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo Normal ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student não pareado.

Comparando-se o número médio de corpúsculos apoptóticos das LPN persistentes com seus respectivos tecido não pré-neoplásico, pode-se notar que não há diferenças nos grupos, apesar do valor numérico elevado encontrado para LPN persistentes do grupo Água.

Considerando-se as diferenças entre os números médios de corpúsculos apoptóticos por mm^2 das LPN em remodelação, constata-se que houve um aumento desse número quando comparado ao tecido não pré-neoplásico, nos grupos Água, AO e AU ($p < 0,05$). No grupo OM, porém, apesar de haver quase o dobro de corpúsculos apoptóticos, em média, em relação ao seu tecido não pré-neoplásico, esse valor não atingiu significância estatística.

Observa-se um maior número médio de corpúsculos apoptóticos nas LPN em remodelação de todos os grupos quando comparadas com as LPN persistentes. Estes valores, porém, apresentam diferença estatisticamente significativa apenas no grupo AO ($p < 0,05$), ao passo em que apresentam tendência de diferença nos grupos OM e AU, com $p = 0,094$ e $0,065$, respectivamente.

Os grupos AO e AU apresentaram maior número de corpúsculos apoptóticos nas LPN em remodelação quando comparados ao grupo controle OM ($p < 0,05$).

As LPN totais dos grupos Água e AU apresentaram maior número de corpúsculos apoptóticos se comparados ao grupo Normal ($p < 0,05$). Da mesma maneira, as LPN persistentes do grupo Água apresentaram maior número de corpúsculos apoptóticos quando comparado ao grupo Normal ($p < 0,05$). Também observa-se um maior número de corpúsculos apoptóticos nas LPN em remodelação dos grupos Água, AO e AU em relação ao grupo Normal ($p < 0,05$).

Figura 11 - Exemplo de corpúsculo apoptótico detectado em corte histológico de fígado de rato F344 submetido ao modelo do RH e corado com hematoxilina e eosina (H&E) em luz normal transmitida (A), e a mesma região do corte observada em microscopia de fluorescência (B). As setas indicam o corpúsculo apoptótico. Objetiva de 40X.

4.9 Índice de Crescimento Ajustado

Os resultados obtidos com a dupla-marcação imunoistoquímica para GST-p e BrdU permitiram fazer a contagem de hepatócitos proliferando em diferentes instâncias, a saber, no tecido não pré-neoplásico, e nas LPN persistentes ou em remodelação. De maneira semelhante, foi feita a contagem de corpúsculos apoptóticos, ou seja, discriminando-se sua localização no tecido hepático. Assim, a taxa real de crescimento das populações celulares pôde ser analisada, sendo considerada positiva ou negativa (KONG e RINGER, 1996).

De posse dessas informações, pôde ser obtido o **Índice de Crescimento Ajustado** (ICA), que é calculado dividindo-se a média da contagem de corpúsculos apoptóticos por mm² de área (tecido não pré-neoplásico, LPN persistente ou em remodelação) pela média da contagem de marcação para BrdU por mm² de área (tecido não pré-neoplásico, LPN persistente ou em remodelação).

Esse Índice de Crescimento Ajustado tem por significado o quanto uma população celular prolifera ou morre. Portanto, se esse índice estiver abaixo de 1, o mesmo indica que o tecido está proliferando mais do que morrendo. Ao contrário disso, se o índice estiver acima de 1, considera-se que a população celular está diminuindo.

O ICA foi calculado para os ratos da linhagem F344 do grupo Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. O resultado pode ser observado na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Índice de Crescimento Ajustado de tecido hepático de ratos da linhagem F344 do grupo Normal e de tecido não pré-neoplásico ao redor das LPN (focos e nódulos de hepatócitos), e das próprias LPN, sejam elas totais, persistentes ou em remodelação dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

Grupos	Tecido não pré-neoplásico	LPN Totais	LPN Persistentes	LPN em Remodelação	Normal
Normal	-	-	-	-	0,44 ± 0,20
Água	0,48 ± 0,35	0,63 ± 0,58	0,51 ± 0,50	1,51 ± 0,68 ^{a,b,c,d}	-
OM	0,54 ± 0,52	0,58 ± 0,30 ^a	0,41 ± 0,19	2,50 ± 2,43 ^{a,b,c,d}	-
AO	0,34 ± 0,36 ^a	0,61 ± 0,86 ^a	0,45 ± 0,61 ^a	2,21 ± 3,07 ^{a,b}	-
AU	0,85 ± 0,89 ^a	0,78 ± 0,57 ^a	0,64 ± 0,45 ^a	1,73 ± 1,43 ^{a,c}	-

LPN= lesão pré-neoplásica;

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento;

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água;

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho;

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico;

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico;

^adiferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo "Normal" ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student não pareado.

^bdiferença estatisticamente significativa em comparação com o tecido não pré-neoplásico ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student pareado.

^cdiferença estatisticamente significativa em comparação com as LPN Persistentes ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student pareado.

^ddiferença estatisticamente significativa em comparação com LPN Totais ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student pareado.

Pode-se observar na **Tabela 11** que o ICA do grupo Normal, bem como do tecido não pré-neoplásico, das LPN totais e das LPN persistentes de todos os grupos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH (Água, OM, AO e AU) esteve abaixo de 1.

Por outro lado, as LPN em remodelação de todos os grupos submetidos ao modelo do RH, ou seja, Água, OM, AO e AU, apresentaram ICA maior que 1.

Os ICAs das LPN em remodelação apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados aos ICAs das LPN persistentes de todos os grupos ($p < 0,05$), exceto do grupo AO ($p = 0,12$).

4.10 Verificação da Intensidade dos Danos no DNA (Técnica do COMETA)

Para se verificar a intensidade de danos no DNA dos animais dos grupo Normal, Água, OM, AO e AU, utilizou-se no presente estudo o método do “cometa”.

A **Tabela 12** apresenta os valores referentes aos comprimentos dos “cometas” obtidos com os fígados dos ratos F344 dos grupos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (Água, OM, AO, AU) durante 8 semanas consecutivas, bem como do grupo Normal tratado ou não com peróxido de hidrogênio (controles positivo e negativo, respectivamente). Exemplos de cometas podem ser observados na **Figura 12**.

Tabela 12 - Comprimento dos “Cometas” (μm) dos fígados de ratos da linhagem F344 dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH, bem como dos hepatócitos dos ratos tratados ou não com peróxido de hidrogênio (controles positivo e negativo, respectivamente).

Grupo/ n	Comprimento dos “Cometas”(μm)*
Normal/11	98,8 $\pm$ 4,6 ^{a,c}
H ₂ O ₂ /10	178,3 $\pm$ 5,1 ^d
Água/10	107,0 $\pm$ 4,5 ^{a,b}
OM/11	111,7 $\pm$ 5,6 ^{a,b,c}
AO/ 6	120,2 $\pm$ 6,0 ^{a,b,c,d}
AU/10	117,2 $\pm$ 7,0 ^{a,b,c,e}

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento;

H₂O₂= grupo Normal cujos hepatócitos foram tratados com peróxido de hidrogênio;

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água;

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho;

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico;

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico;

n= número de animais, *média $\pm$ desvio-padrão;

^adiferença estatisticamente significativa em relação ao grupo H₂O₂ (p< 0,05), segundo o teste t de Student não pareado.

^bdiferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Normal (p< 0,05), segundo o teste t de Student não pareado.

^cdiferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Água (p< 0,05), segundo o teste t de Student não pareado.

^ddiferença estatisticamente significativa em relação ao grupo OM ($p < 0,05$), segundo o teste t de Student não pareado.

^etendência de diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo OM ($p = 0,061$), segundo o teste t de Student não pareado.

Pode-se observar na **Tabela 12** que todos os grupos submetidos ao modelo do RH (Água, OM, AO e AU), apresentaram “cometas” de comprimento maior quando comparados ao grupo Normal ($p > 0,05$). Da mesma forma, observa-se “cometas” de comprimento maior nos grupos OM, AO e AU quando comparados ao grupo Água ($p < 0,05$).

O grupo AO apresentou “cometas” de comprimento maior quando comparado ao grupo controle OM ($p < 0,05$). O grupo AU apresentou aumento de comprimento de “cometas” quando comparado ao grupo controle OM, com tendência de diferença estatística ($p = 0,061$).

A)

B)

Figura 12 – Exemplo de “cometas” de hepatócitos de ratos F344, (A) do grupo Normal e (B) tratado com óleo de milho (grupo OM) durante 8 semanas consecutivas e submetido ao modelo do RH (Protocolo Experimental, **Figura 4**). Objetiva de 10x.

4.11 Análise de p65 Nuclear por “western blot”

Preparações de extratos protéicos nucleares dos fígados dos animais dos grupos Normal, Água, OM, AO e AU foram submetidas à eletroforese de gel de poliacrilamida e “imunoblot” para a proteína p65 (NF- κ B).

A **Figura 13** apresenta exemplo de filme fotográfico com bandas obtidas pela técnica de “western blot”. A leitura de intensidade das bandas foi efetuada por meio de densitometria. Os valores assim obtidos foram expressos em unidades densitométricas arbitrárias, e os resultados podem ser graficamente visualizados na **Figura 14**.

Figura 13 - Filme fotográfico mostrando bandas obtidas pela técnica de “western blot” da proteína p65 de extratos nucleares (A), totais (B) e citoplasmáticos (C) de fígado de ratos F344 submetidos ao Protocolo Experimental (Figura 4). As bandas estão na altura de 65 kDa, correspondente ao p65. Abaixo de cada filme, respectiva membrana de nitrocelulose corada com “Coomassie Blue”, para normalização de acordo com a quantidade de proteína de extrato nuclear de cada amostra carregada no gel de poliacrilamida. As amostras são:

1 e 2 grupo controle Normal; 3 a 5, grupo Água; 6 ao 8, grupo OM; 9 ao 11, grupo AO; 12 ao 14, grupo AU.

Figura 14 - "western blot" da proteína p65 de extratos nucleares de fígado de ratos F344 submetidos ao Protocolo Experimental (**Figura 4**). Os valores (média $\pm$ erro padrão) estão expressos em unidades densitométricas arbitrárias dos grupos submetidos ao modelo do RH em relação ao grupo controle Normal, considerado como 1.

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento (n = 4);

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água (n = 6);

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho (n = 6);

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico (n = 6);

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico (n = 6).

^adiferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo Normal ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student.

^bdiferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo OM ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student.

Como pode ser observado na **Figura 14**, todos os grupos submetidos ao modelo do RH (Água, OM, AO e AU), apresentam aumento da presença de p65 nuclear quando comparados ao grupo Normal, sendo este aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Os grupos AO e AU apresentam aumento da presença de p65 nuclear quando comparados ao grupo controle OM ($p < 0,05$).

4.12 Expressão de p65 Hepático por “western blot”

Além da análise da presença de p65 no núcleo das células, que nos dá idéia da sua ativação, foi avaliada a expressão de p65, fazendo uso da técnica de “western blot” (MUKHOPADHAYAY et al., 1995, LIU et al., 2002, BOURS et al., 1994), ilustrada na **Figura 13**. Para tanto, foi utilizado extrato protéico de tecido hepático de ratos da linhagem F344 dos grupos Normal e dos grupos Água, OM, AO e AU submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH.

O resultado pode ser visto no **Figura 15** a seguir:

Figura 15 - “western blot” da proteína p65 de extrato protéico total de fígado de ratos F344 submetidos ao Protocolo Experimental (**Figura 4**). Os valores (média $\pm$ erro padrão) estão expressos em unidades densitométricas arbitrárias dos grupos submetidos ao modelo do RH em relação ao grupo controle Normal, considerado como 1.

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento (n = 4);

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água (n = 6);

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho (n = 6);

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico (n = 6);

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico (n = 6).

^adiferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo Normal ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student.

^bdiferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo OM ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student.

Os resultados apresentados na **Figura 15** demonstram que o modelo de hepatocarcinogênese promoveu um aumento da expressão de p65 no fígado. A análise estatística dos dados revela que todos os grupos submetidos ao modelo do RH tiveram um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo Normal ($p < 0,05$).

O grupo AO apresentou aumento de expressão de p65 em relação ao grupo OM, com tendência de diferença estatística ($p = 0,06$). O grupo AU apresentou um aumento da expressão de p65, quando comparado ao grupo controle OM.

4.13 Avaliação da Presença de p65 no Citoplasma por “western blot”

Com o intuito de avaliarmos a presença de p65 na fração citoplasmática das células do tecido hepático dos diferentes grupos experimentais, foi utilizada a técnica de “western blot” nos extratos protéicos referentes ao citoplasma, obtidos por ocasião da extração das frações de proteína nuclear, como descrito no Item Material e Métodos. O resultado da técnica é ilustrado na **Figura 13**.

A análise quantitativa da intensidade das bandas é mostrada na **Figura 16**.

Figura 16 - “western blot” da proteína p65 de fração citoplasmática de fígado de ratos F344 submetidos ao Protocolo Experimental (**Figura 4**). Os valores (média $\pm$ erro padrão) estão expressos em unidades densitométricas arbitrárias dos grupos submetidos ao modelo do RH em relação ao grupo controle Normal, considerado como 1.

Normal= grupo não submetido a qualquer tratamento (n = 4);

Água= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com água (n = 6);

OM= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com óleo de milho (n = 6);

AO= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido oleanólico (n = 6);

AU= grupo submetido ao modelo do RH e entubado com ácido ursólico (n = 6).

^adiferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo Normal ($p < 0,05$), de acordo com o teste t de Student.

Segundo o resultado obtido, observa-se na **Figura 16** que nos grupos submetidos ao modelo do RH (grupos Água, OM, AO e AU) há um aumento da presença de p65 no citoplasma em relação ao grupo Normal. Não foram observadas diferenças na intensidade das bandas entre os grupos submetidos ao modelo do RH. No entanto, em nenhum dos grupos os valores de unidades densitométricas arbitrárias alcançaram diferença estatística. O grupo AO, entretanto, apresentou uma tendência de diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Normal ($p= 0,057$).

4.14 Imunoistoquímica de p53

Foi feita a marcação imunoistoquímica para a proteína p53 nos fígados dos grupos submetidos ao modelo do RH. A **Figura 17** ilustra marcações citoplasmáticas para p53, enquanto a **Figura 18** ilustra o controle positivo de marcação para p53 nuclear.

Observou-se marcação citoplasmática de p53 nos hepatócitos de uma parte das LPN. Raras marcações nucleares para p53 foram observadas, e o tecido não pré-neoplásico adjacente à essas LPN não apresentou presença de p53 detectável por imunoistoquímica. Foi feita a contagem total das LPN p53 positivas, e o resultado é expresso em porcentagem de LPN na **Tabela 13**.

Figura 17 - Digitalização de lâmina com corte histológico de fígado de rato F344 tratado durante 8 semanas consecutivas com óleo de milho (grupo OM, controle) e submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do RH (Protocolo Experimental, **Figura 4**). **A)** LPN persistente marcada para p53. Objetiva de 10x. **B)** Detalhe de LPN persistente marcada para p53. Objetiva de 20x. **C)** Detalhe de imunomarcação citoplasmática de p53 de hepatócitos de uma LPN persistente. A seta indica hepatócito com acúmulo de p53 no citoplasma. Objetiva de 40x.

Figura 18 - Controle positivo para marcação imunoistoquímica de p53, carcinoma de células escamosas (DakoCytomation, Carpinteria), no qual se observa marcação nuclear para a proteína p53. Objetiva de 40X.

Tabela 13 - Porcentagem (%) de LPN com marcação imunoistoquímica de p53 citoplasmática, em ratos F344 dos grupos Água, OM, AO e AU e submetidos ao modelo do RH.

Grupo	Água	OM	AO	AU
Porcentagem	47,9%	33,7%	24,9%	47,2%

Observa-se na **Tabela 13** que, no grupo Água, 47,9% das LPN mostraram marcação citoplasmática para p53. Já o grupo OM apresentou 33,7% de LPN com marcação positiva para p53, enquanto no grupo AO 24,9% das LPN eram p53 positivas. No grupo AU observou-se 47,2% das LPN com marcação imunoistoquímica citoplasmática para p53.

Da contagem total de LPN marcadas imunoistoquimicamente para p53, foi feita a discriminação entre LPN persistentes e em remodelação. O resultado dessa análise é mostrado na **Tabela 14** em forma de porcentagem de LPN totais marcadas para p53.

Tabela 14 - Porcentagem (%) de LPN persistentes (PER) e em remodelação (REM) do total de LPN com marcação imunoistoquímica de p53 citoplasmática, em ratos F344 dos grupos Água, OM, AO e AU e submetidos ao modelo do RH.

	Água	OM	AO	AU
PER	77,2%	66,5%	69,6%	69,7%
REM	22,8%	33,5%	30,4%	30,3%

Como pode ser observado no **Tabela 13**, de uma maneira geral nos grupos, as LPN persistentes respondem pela maior parte das LPN imunomarcadas para p53. Assim, observa-se que no grupo Água, 77,2% das LPN p53 positivas são persistentes, e 22,8% são LPN em remodelação. No grupo OM, 66,5% das LPN com marcação para p53 são persistentes, enquanto 33,5% são LPN em remodelação. De maneira semelhante, no grupo AO, as LPN persistentes respondem por 69,6% das

lesões p53 positivas, e as LPN em remodelação por 30,4%. No grupo AU, 69,7% das LPN imunomarcadas para p53 são persistentes, e 30,3% são LPN em remodelação.

As LPN em remodelação representam, em todos os grupos analisados, aproximadamente um terço do total de LPN marcadas para p53.

4.15 Imunoistoquímica da Proteína bcl-2

Cortes histológicos dos fígados dos grupos submetidos ao modelo do RH foram marcados por imunoistoquímica para bcl-2, e foram contadas as LPNs persistentes ou em remodelação nas quais a imunomarcção de bcl-2 esteve aumentada em relação ao tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas. O controle negativo da imunoistoquímica resultou em ausência de marcação. A **Figura 19** ilustra a marcação imunoistoquímica de bcl-2 em LPN. Foi observado que apenas uma parte das LPN apresentavam imunomarcção mais intensa que o seu tecido não pré-neoplásico adjacente, e as mesmas foram contadas, discriminando-se entre LPN persistentes e em remodelação. O resultado da contagem pode ser visto na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Porcentagem (%) de LPN com marcação imunoistoquímica mais intensa de bcl-2, em ratos F344 dos grupos Água, OM, AO e AU e submetidos ao modelo do RH.

Grupo	Água	OM	AO	AU
Porcentagem	46,1%	39,1%	36,1%	38,5%

Observa-se na **Tabela 15** que 46,1% das LPN do grupo Água mostraram marcação mais intensa de bcl-2. O grupo OM apresentou 39,1% de LPN com marcação mais intensa para bcl-2, enquanto no grupo AO 36,1% das LPN eram bcl-

2 positivas. 38,5% das LPN do grupo AU apresentaram marcação imunoistoquímica mais intensa para bcl-2.

Da contagem total de LPN mais intensamente marcadas para bcl-2, foi feita a discriminação entre LPN persistentes e em remodelação. O resultado dessa análise é mostrado na **Tabela 16** em forma de porcentagem de LPN totais marcadas para bcl-2.

Tabela 16 - Porcentagem (%) de LPN persistentes (PER) e em remodelação (REM) do total de LPN com marcação imunoistoquímica mais intensa de bcl-2, em ratos F344 dos grupos Água, OM, AO e AU e submetidos ao modelo do RH.

	Água	OM	AO	AU
PER	78,4%	72,6%	73,0%	70,4%
REM	21,6%	27,4%	27,0%	29,6%

Como pode ser observado no **Tabela 16**, as LPN persistentes respondem pela maior parte das LPN mais intensamente imunomarcadas para bcl-2 em todos os grupos submetidos ao modelo do RH. Assim, observa-se que no grupo Água, 78,4% das LPN mais intensamente marcadas para bcl-2 são persistentes, enquanto 21,6% são LPN em remodelação. No grupo OM, 72,6% das LPN com marcação para bcl-2 são persistentes, e 27,4% são LPN em remodelação. No grupo AO, as LPN persistentes perfazem 73,0% das lesões bcl-2 positivas, enquanto as LPN em remodelação representam 27% do total de lesões com marcação mais intensa de bcl-2. No grupo AU, 70,4% das LPN imunomarcadas para bcl-2 são persistentes, e 29,6% são LPN em remodelação.

As LPN em remodelação representam, em todos os grupos analisados, aproximadamente um terço do total de LPN marcadas para bcl-2.

Figura 19 - Digitalização de lâmina de corte histológico de fígado de rato F344 tratado durante 8 semanas consecutivas com óleo de milho (grupo OM, controle) e submetido ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. Verificar imunomarcção para bcl-2 (**A**, objetiva de 10X), onde se vê aumento de expressão da proteína referida em LPN, e detalhe mostrando marcação citoplasmática em LPN (**B**, objetiva de 40X).

5 DISCUSSÃO

5.1 Dose dos Ácidos Oleanólico e Ursólico

A escolha da dose das substâncias com eventuais atividades quimiopreventivas a serem administradas aos ratos do atual experimento foi realizada, essencialmente, e por motivos de ordem prática, com base na literatura. Dessa forma, Yoshimi e colaboradores, 1992, trataram ratos com ácido oleanólico adicionado à ração, em uma concentração de 200 mg/kg. Considerando-se que um rato F344 pesando 200 g consome, em média, cerca de 20 g de ração ao dia, o mesmo ingere, conseqüentemente, em torno de 4 mg/dia da substância. Essa dosagem (2 mg/100 g de rato por dia, considerando-se o consumo de ração) foi suficiente, no caso, para que os animais em questão apresentassem uma menor incidência e multiplicidade de neoplasias intestinais induzidas por azoximetano.

Portanto, e levando-se também em conta para efeitos de comparação nossos experimentos anteriores realizados com outros derivados do metabolismo do mevalonato (p. ex., β -caroteno) (DAGLI et al., 1998; MORENO et al., 1991, 1995 a e b, 2002; NAVES et al. 2001; RIZZI et al., 1997 e 1998) decidiu-se que os ratos F344 deveriam receber no presente estudo, por entubação gástrica, ácido oleanólico ou ursólico em óleo de milho na dosagem de 8 mg/100g de rato por dia durante oito semanas consecutivas.

Outra informação considerada importante nas atuais circunstâncias e também observável na **Figura 5** está relacionada, eventualmente, a efeitos tóxicos das substâncias testadas (ácidos oleanólico e ursólico, principalmente o primeiro) quando da aplicação concomitante do modelo do RH. Assim, nota-se que durante as duas primeiras semanas de entubação, e isto previamente à administração da DEN, os pesos dos animais de todos os grupos experimentais eram equivalentes, ou seja, as substâncias não causaram redução no ganho de peso neste período, o que pode ser indício de ausência de toxicidade na dosagem utilizada (8 mg/100 g p.c./dia). Esse padrão de ganho de peso corpóreo se manteve somente até a hepatectomia parcial. Todavia, após a mesma os grupos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados diariamente com os ácidos oleanólico e ursólico apresentaram uma

diminuição do ganho ponderal em relação aos demais grupos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese.

Esta redução no ganho de peso pode talvez estar também relacionada, mais especificamente, às mortes ocorridas após a hepatectomia parcial no grupo de animais tratados com ácido oleanólico. Desta forma, esse grupo experimental que iniciou o estudo com 11 animais, teve uma ocorrência de cinco mortes na semana seguinte à hepatectomia. Talvez estas mortes não estiveram envolvidas a complicações cirúrgicas, uma vez que as mesmas não foram constatadas no grupo controle que foi entubado com óleo de milho, ou até mesmo no grupo de animais tratados com ácido ursólico. O estado debilitado dos ratos antes de suas mortes era marcado por perda progressiva e excessiva de peso, bem como, talvez, anemia evidenciada pela perda da coloração avermelhada típica nos olhos, orelhas e cauda. À necrópsia dos mesmos constatou-se que seus fígados não regeneraram adequadamente, ou regeneraram muito pouco, após a hepatectomia parcial, apresentado-se atrofiados e de tonalidade clara, talvez indicando insuficiência hepática. A esse respeito, por ocasião do sacrifício dos 6 ratos restantes do grupo AO ao final do experimento, constatou-se que o peso médio dos fígados e o peso relativo dos fígados dos ratos desse grupo eram menores quando comparados ao grupo controle OM (**Tabela 1**).

Em contrapartida, o grupo de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com ácido ursólico não apresentou mortalidade digna de nota. No caso, apenas um dos ratos morreu logo após a hepatectomia parcial, muito provavelmente devido a complicações cirúrgicas.

No presente trabalho não foi possível determinar a causa das mortes observadas na vigência da hepatectomia parcial no grupo tratado com ácido oleanólico. A literatura científica não apresenta relatos de hepatotoxicidade por parte de AO. Ao contrário, é relativamente extensa a literatura tratando dos efeitos hepatoprotetores deste triterpenóide, bem como do AU (MA et al., 1982; HAN et al., 1981; LIU et al., 1995). Descreve-se que um dos possíveis mecanismos para essa hepatoproteção seja uma diminuição da atividade de citocromo P-450. Algumas substâncias hepatotóxicas requerem ativação metabólica através do citocromo P-450, e o succinato de ácido oleanólico reduz a concentração de citocromo P-450 microsomal (ZHANG e LIU, 1984). Também foi observada uma inibição da atividade de citocromo P-450 microsomal de fígado (25-37%) e citocromo b5 (20%), mas sem

efeito em relação à NADPH-citocromo c redutase. O tratamento de camundongos com ácido oleanólico inibiu a atividade das enzimas CYP1A e CYP2A, mas não teve efeito em relação a CYP3A, com resultados similares para o ácido ursólico (LIU et al., 1995). Além disso, foi demonstrado que AO inibiu completamente a atividade de CYP1A2 e CYP3A4, enquanto AU inibiu completamente a atividade de CYP2C19, ambos em microsossomos hepáticos humanos. Em outras CYPs avaliadas, no entanto, AO e AU apresentaram pouca ou nenhuma inibição (KIM et al., 2004).

Desta forma, os efeitos protetores de AO e AU contra bromobenzeno, tioacetamida, CCl₄ e furosemida em camundongos poderiam, eventualmente, ser parcialmente atribuídos à supressão das enzimas do sistema do citocromo P-450. Dessa forma, substâncias que dependem de ativação enzimática pelo citocromo P-450 para se tornarem mais tóxicas teriam sua toxicidade diminuída (ZHANG e LI, 1992; LIU et al., 1995).

Apesar de não ser o objetivo do presente estudo uma análise da possível toxicidade de AO e AU, pode-se supor que o ácido oleanólico, na dose testada, talvez tenha modificado a atividade da enzima do citocromo P4501A1 (CYP1A1), principal responsável pela biotransformação do 2-AAF em fígado de ratos (SPARFEL et al., 2002), e que esta modificação talvez possa ter influído na ativação do 2-acetilaminofluoreno, aumentando-a e, portanto, inibindo de modo exacerbado a mitose dos hepatócitos normais (não iniciados). Pode-se supor que essa provável ativação anormal de 2-AAF após a hepatectomia parcial tenha acarretado em uma incapacidade de o fígado regenerar-se, resultando na morte dos 5 animais entubados com ácido oleanólico. Segundo essa hipótese, as mortes não seriam causadas diretamente por AO, mas por uma potencialização do agente mitoinibitório 2-AAF.

5.2 Ausência de Quimioprevenção por Parte dos Triterpenóides Observada a Macroscopia do Fígado

Pode-se observar na **Tabela 2** que os quatro grupos experimentais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH (grupos Água, OM, AO e AU) apresentaram 100% de incidência de lesões pré-neoplásicas

macroscopicamente visíveis, o que por si só já reflete, de certo modo, o bom andamento do experimento e a sensibilidade da linhagem de ratos F344 à indução da hepatocarcinogênese, a qual se descreve ser mais susceptível a modelos de carcinogênese quando comparada a outras linhagens como a Wistar, por exemplo (WOOD et al., 2002).

Além disso, observa-se ainda nessa **Tabela 2** que a multiplicidade de nódulos de hepatócitos do grupo entubado com ácido oleanólico (AO) e submetido ao modelo do RH foi bastante semelhante à de seu respectivo grupo controle, ou seja, a do grupo óleo de milho (OM). Dessa forma, isso indica que o ácido oleanólico não apresentou efeitos quimiopreventivos dignos de nota quando administrado diariamente por 8 semanas consecutivas a ratos da linhagem F344 submetidos ao modelo do RH, ao contrário do observado em estudos efetuados em outros modelos de carcinogênese, bem como em experimentos *in vitro* e *in vivo* (OHIGASHI et al., 1986; TOKUDA et al., 1986; YOSHIMI et al., 1992; LEE et al., 1994).

Já o grupo que recebeu ácido ursólico (AU), apresentou, ao contrário do que se esperava, uma multiplicidade maior do que a dos demais grupos submetidos ao modelo do RH, inclusive a do respectivo grupo controle entubado somente com óleo de milho, apesar de não ter atingido diferença estatística. Este aumento no número de LPN hepáticas macroscópicas pode indicar que o AU tenha apresentado no presente modelo um efeito indutor da carcinogênese.

Da mesma forma, vale ressaltar que no grupo AU, observou-se não apenas um maior número de nódulos (**Tabela 2**), mas uma tendência a terem dimensões maiores quando comparados ao nódulos de outros grupos (**Tabela 3**), o que sugere um efeito promotor por parte do ácido ursólico quando administrado em ratos submetidos ao modelo do RH.

Jie Liu (1995), em seu trabalho de revisão a respeito da farmacologia de AO e AU, descreve que o primeiro é capaz de proteger o fígado da toxicidade induzida por substâncias como o CCl₄, cádmio, bromobenzeno, furosemda e outros compostos hepatotóxicos conhecidos. Em contrapartida, o ácido oleanólico mostrou-se ineficaz contra a toxicidade induzida pela dimetilnitrosamina (DMN), substância semelhante ao agente iniciante utilizado em nosso modelo de hepatocarcinogênese (LIU et al., 1995).

Além disto, esse mesmo autor descreve que o AO, administrado a ratos hepatectomizados na dose de 100 mg/kg aumentou a regeneração do fígado, como

indicado pelo aumento das mitoses, o que sugere uma ação do composto em nível de proliferação celular. No presente trabalho, observa-se que o AU tendeu a aumentar o número e o tamanho de LPN macroscópicas, o que talvez possa ter relação com o que foi observado para o AO no trabalho de revisão. Considerando-se que na vigência da hepatectomia do nosso modelo os hepatócitos não iniciados se encontram sob os efeitos mitoinibitórios do 2-AAF, pode-se supor que os iniciados, que são descritos como capazes de escaparem dessa mitoinibição, estejam mais sujeitos a uma estimulação pelo isoprenóide, com conseqüente indução da carcinogênese nessas condições experimentais (LIU, 1995).

De maneira semelhante ao observado inclusive no presente estudo, Karim e colaboradores (2002) não constataram uma ação digna de nota por parte dos triterpenóides EC-2 e EC-4 quando administrados a ratos F344 submetidos a modelo de hepatocarcinogênese de médio prazo induzida pela DEN e por uma hepatectomia parcial.

Além disso, considerando-se a ausência de atividade quimiopreventiva por parte dessas substâncias, ou a tendência de aumento de nódulos por parte do AU, vale lembrar que as informações a respeito de seu metabolismo são escassas, e pouco se sabe que tipo de biotransformações elas poderiam sofrer, sobretudo no tecido hepático, *in vivo*. Nesse sentido, Hollosy e colaboradores (2001) descreveram que o ácido ursólico perdeu toda a sua atividade quimiopreventiva, baseada em estímulo de apoptose, em células de carcinoma epidermóide humano A431, quando substituído por seu derivado natural chamado metil-ursolato beta D-glicosilado, o qual possui um radical metil em sua carboxila e é glicosilado no carbono 3 de sua cadeia.

Estes dados mostram o quão importante é a relação da estrutura molecular com a sua atividade farmacológica, de maneira que se esses triterpenóides tiverem sofrido alguma modificação pelas células hepáticas, esta pode ter interferido na quimioprevenção, como observado à macroscopia.

5.3 Microscopia do Fígado e Contagem das LPN GST-p Positivas

Dentre os vários protocolos de hepatocarcinogênese existentes para ratos, o modelo do “hepatócito resistente” está bem caracterizado e é suficiente para induzir elevada incidência de cânceres (SOLT e FARBER, 1976).

O sistema consistia, originalmente, na administração única de agente iniciante, a DEN, seguida de procedimento de seleção por meio do qual se adicionava 2-AAF às rações, em combinação com uma hepatectomia parcial à 70% (SOLT e FARBER, 1976). Posteriormente, devido a restrições legais em diversos países quanto à adição de substâncias carcinogênicas às rações dos animais, optou-se pela aplicação intragástrica do 2-AAF (SEMPLE-ROBERTS et al., 1987).

Este tem como característica o fato de produzir as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de forma sincronizada, possibilitando, desta forma, estudos mais detalhados. Seu desenvolvimento baseou-se na hipótese, agora já bastante comprovada, de que diversos carcinogênicos químicos são capazes de produzir hepatócitos resistentes e um novo fenótipo constitutivo com um padrão bioquímico altamente característico, um fenótipo resistente, durante a etapa de iniciação do processo carcinogênico, se ocorre um ciclo de proliferação celular (FARBER e SARMA, 1987; LACONI et al., 2000).

Tais hepatócitos resistentes podem ser rapidamente estimulados de modo a formarem proliferações focais (focos e nódulos) após breve exposição não iniciante a reduzidas concentrações de alguns carcinogênicos, tais como o 2-AAF, associada a estímulo mitogênico representado por uma hepatectomia parcial (SOLT e FARBER, 1976; FARBER e SARMA, 1987; FARBER e RUBIN, 1991; PITOT et al., 1996; LACONI et al., 2000).

O 2-AAF, da mesma forma que a grande maioria, se não todos os carcinogênicos genotóxicos, é capaz de inibir a proliferação da maior parte dos hepatócitos normais, ou seja, dos não iniciados (sensíveis), talvez por um bloqueio na atividade da DNA polimerase, devido à formação de adutos de DNA. Este não é capaz, entretanto, de inibir os poucos hepatócitos resistentes que apresentam, caracteristicamente, atividades das enzimas das fases I e II responsáveis pela

metabolização de xenobióticos, diminuídas ou aumentadas, respectivamente (ROOMI et al., 1985).

A pressão de seleção para gerar focos e nódulos desse modelo é intensa, e as células resistentes proliferam, portanto, de forma sincronizada. Esta sincronia persiste pelas múltiplas etapas de desenvolvimento do processo carcinogênico (FARBER e SARMA, 1987).

Em diversos protocolos de hepatocarcinogênese a proliferação dos hepatócitos em focos e nódulos é bastante lenta, em geral assincrônica, necessitando muitas semanas, ou mesmo alguns meses, para que se formem nódulos hepáticos visíveis. Já no modelo do RH isto acontece, ao contrário, de forma rápida e sincronizada, de modo que nódulos precoces já podem ser observados macroscopicamente em uma ou duas semanas após a etapa de seleção/promoção inicial.

A grande maioria desses nódulos precoces, cerca de 95-98%, sofre remodelação, um processo altamente complexo envolvendo mudanças no suprimento sanguíneo e em características bioquímicas, bem como da estrutura e arquitetura celulares, retornando ao aspecto “normal” anterior do fígado. Uma pequena parte (2-5%) segue outro caminho, o da persistência (TATEMATSU et al., 1983; FARBER e RUBIN, 1991; IMAI et al., 1997).

Justamente em nódulos persistentes de hepatócitos é que claramente se conseguiu demonstrar que estes atuam como locais de futura evolução para o câncer.

Quando estudados em detalhe os nódulos apresentam padrões característicos de organização e estrutura celular, arquitetura e histoquímica, sendo bastante diferentes do fígado normal em quaisquer de suas etapas de desenvolvimento. Deve-se ressaltar, entretanto, que a pequena população de nódulos persistentes apresenta o mesmo padrão bioquímico observado na maioria dos nódulos que sofre remodelação (nódulos precoces) (FARBER e SARMA, 1987; FARBER, 1990).

Portanto, a maior parte dos nódulos persistentes tem o mesmo padrão de remodelação que a maioria dos nódulos, embora muito mais lento, não existindo evidências de que nódulos que se remodelam e aqueles que persistem representem, na verdade, duas respostas inteiramente diferentes à ação de carcinogênicos (FARBER, 1990).

Nesse sentido, apesar de uma maturação ou reversão fenotípica ter sido previamente sugerida como responsável pelo fenômeno da remodelação (KITAGAWA, 1971; KITAGAWA e PITOT, 1975; WILLIAMS, 1980), bem como não se ter podido descartar a possibilidade da ocorrência de uma reposição progressiva de hepatócitos crescendo a partir do tecido não pré-neoplásico ao redor dos nódulos, acredita-se, mais recentemente, que este possa envolver, na verdade, a rediferenciação dos hepatócitos dos nódulos para um fenótipo semelhante ao do adulto (TATEMATSU et al., 1983; FARBER et al., 1988; FARBER e RUBIN, 1991), ou até mesmo a morte e remodelação das células por apoptose (SCHULTE-HERRMANN et al., 1990).

De qualquer forma, a informação para este evento espontâneo, uma expressão genética bastante complexa, parece já estar normalmente inserida no genoma (FARBER et al., 1988; FARBER e RUBIN, 1991; IMAI et al., 1997). Além disso, acredita-se, ainda, que a persistência dos nódulos talvez indique justamente um bloqueio na remodelação por diferenciação (FARBER et al., 1988; FARBER e RUBIN, 1991), podendo estar relacionada com uma maior tendência de evolução para os carcinomas hepatocelulares (OHASHI et al., 1996).

De acordo com a **Tabela 4**, pode-se observar que em um modelo de carcinogênese de 6 semanas após a iniciação, a quantidade de LPN em remodelação em relação ao número médio de LPN persistentes ainda é muito grande. Como se sabe, a maior parte das LPN (95 a 97%) remodelam; todavia, esse fenômeno, nessas condições, pode ser melhor observado ao longo de vários meses. Nossos dados, portanto, estão em acordo com a literatura (TATEMATSU et al., 1983; FARBER e RUBIN, 1991; IMAI et al., 1997).

Em relação ao número de LPN marcadas imunoistoquimicamente para a enzima GST-p (**Tabela 4**), é interessante notar que o grupo experimental OM apresentou maior número de LPN/cm² quando comparado ao grupo Água. Pode-se supor que o óleo de milho seja o responsável pelo aumento do número de LPN observadas à microscopia. Nesse sentido, não se descreve que o óleo de milho apresente atividade como agente iniciante, e sim como promotor (WEISBURGER et al., 1975). Todavia, em nosso experimento com uso de ratos F344, o óleo parece ser o responsável pelo aumento do número de LPN/cm².

Da mesma maneira, observa-se um maior número de LPN em remodelação no grupo OM quando comparado ao grupo Água. Este resultado é talvez muito mais

um reflexo do número total de LPN, que é maior no grupo OM quando comparado ao grupo Água, do que propriamente algum efeito do óleo de milho sobre as LPN em remodelação. Ou seja, tendo o grupo OM uma quantidade maior de LPN totais/cm² quando comparado ao grupo Água, pode-se supor que isto influa nas LPN em remodelação.

Por outro lado, em relação aos grupos AO e AU, o mesmo não pode ser dito, uma vez que não há diferença estatisticamente significativa entre o número de LPN totais/cm² desses e o seu grupo controle OM. Assim, observa-se à **Tabela 4** que os triterpenóides não tiveram efeito sobre o número de LPN totais quando comparados ao grupo OM. O mesmo pode ser dito em relação ao número de LPN persistentes, que foram semelhantes nos três grupos comparáveis.

Analisando-se as LPN em remodelação, contudo, percebe-se que tanto o ácido oleanólico quanto o ursólico diminuíram o seu número/cm² ($p < 0,05$). Assim, não havendo diferença nos números médios de LPN totais e persistentes nos grupos AO e AU em relação ao grupo OM, pode-se argumentar que esses triterpenóides tenham exercido alguma atividade sobre a remodelação, possivelmente estimulando a mesma.

Tal raciocínio baseia-se no fato de a remodelação ser um estágio no qual uma LPN está desaparecendo, seja por rediferenciação ou por morte das células pré-neoplásicas. Dessa forma, se considerássemos um tecido hipotético no qual existissem apenas LPN em remodelação, um estímulo que aumentasse a remodelação faria com que diminuíssem em número, em velocidade muito maior, até seu completo desaparecimento.

No caso dos triterpenóides em questão, o raciocínio anterior pode ser aplicado, levando-se em consideração que, tendo eles potencializado o fenômeno da remodelação apenas nas LPN que efetivamente estavam em processo de remodelação, o resultado é o que se observa na **Tabela 4**, ou seja, uma diminuição do número de LPN em remodelação.

Considerando-se a ausência de atividade quimiopreventiva por parte dos ácidos oleanólico e ursólico, aparentemente, eles apenas conseguiram exercer algum efeito sobre aquelas LPN que já estavam em processo de remodelação, em nada alterando as persistentes. Talvez, o mecanismo de ação pelo qual essas substâncias atuem esteja inibido nas LPN persistentes.

Os ácidos oleanólico e ursólico, todavia, não parecem ter, por si mesmos e nas doses testadas, a capacidade de atuar sobre as LPN persistentes no modelo do RH e em ratos F344.

Em relação à área média das LPN GST-p positivas (**Tabela 5**), não se observa diferenças entre os grupos Água e OM, tanto em LPN persistentes quanto em remodelação, indicando que o óleo de milho, ao menos nas condições testadas e na linhagem de ratos utilizada, não alterou a área média das LPN. Nos grupos AO e AU, as áreas médias das LPN persistentes foi também semelhante às encontradas para os grupos Água e OM. Todavia, observa-se uma diminuição da área média das LPN em remodelação nos grupos AO ($p < 0,05$) e AU (tendência de $p = 0,054$), indicando que esses triterpenóides talvez tenham estimulado o processo da remodelação, em um raciocínio semelhante ao descrito anteriormente para o número de LPN/cm².

Considerando-se a porcentagem da área do corte ocupada por LPN (**Tabela 6**), observa-se que as LPN em remodelação de todos os grupos experimentais ocuparam uma menor porcentagem da área do corte quando comparadas às LPN persistentes.

Também pode-se observar que no grupo OM, há um aumento da porcentagem da área ocupada das LPN em remodelação, quando comparado ao grupo Água. Portanto, nesse parâmetro o efeito promotor do óleo de milho (WEISBURGER et al., 1975) pode ser notado com mais clareza neste experimento.

Nesse sentido, os ácidos oleanólico e ursólico, mais uma vez atuaram nas LPN em remodelação, diminuindo a porcentagem da área do corte ocupada pelas mesmas quando comparados ao grupo OM. Assim, esses triterpenóides aparentemente reverteram o efeito promotor do óleo de milho (seu veículo), e diminuíram a porcentagem da área do corte ocupada pelas LPN em remodelação.

Portanto, considerando-se esses três parâmetros, a saber, o número de LPN/cm², a área média das LPN e a porcentagem da área do corte ocupada por elas, fica claro que os ácidos oleanólico e ursólico modificaram apenas as LPN em remodelação, diminuindo-as tanto em número quanto em tamanho. Esses dados estimulam a idéia de que esses triterpenóides talvez possam atuar por uma via aparentemente inibida nas LPN persistentes, no modelo de hepatocarcinogênese do RH, em ratos F344 e nas doses testadas.

5.4 Ausência de Diminuição dos Níveis de Colesterol Plasmático nos Grupos Tratados com AO e AU

Diversos isoprenóides, incluindo o geraniol e farnesol, têm a capacidade de modular a atividade da enzima HMG-CoA redutase, considerada etapa crítica no metabolismo do colesterol, por meio de mecanismos pós-transcricionais (FITCH et al., 1989; MORENO et al., 1995; FUHRMAN et al., 1997), dentre os quais se destaca o estímulo da degradação da enzima (PARKER et al., 1993).

De acordo com a **Tabela 7**, os grupos submetidos ao modelo do RH apresentaram um aumento de colesterol plasmático, exceto o grupo AO. Nesse sentido, e de certa forma de acordo com os resultados do presente estudo, descreve-se que lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do fígado (SIPERSTEIN, 1984) apresentam perda do mecanismo de retroregulação inibitória da atividade da enzima HMG-CoA redutase, sendo que um aumento na síntese de colesterol foi observado em nódulos hepáticos de ratos submetidos a protocolo de hepatocarcinogênese (LEDA-COLUMBANO et al., 1985).

A ausência de modificação da concentração de colesterol plasmático por tratamento com os triterpenóides AO e AU indica claramente que essas substâncias não foram capazes de induzir diminuição da colesterolemia nas condições utilizadas nesse estudo, como a literatura sugere em outras instâncias (PARFENTEVA, 1980; LIU et al., 1987; MA, 1986).

Baseando-se nesta informação e na igualmente ausente atividade quimiopreventiva por parte desses triterpenóides, pode-se supor que os mesmos não alteraram a expressão da enzima HMG-CoA redutase, uma vez que há correlação entre a inibição da sua expressão e menor incidência de LPN, como se observa no modelo de hepatocarcinogênese do RH (ELSON, 1994; MORENO et al., 1995; ELSON et al., 1999; ESPÍNDOLA et al., 2005).

Em conformidade com essa informação, a expressão do gene que codifica para a HMG-CoA redutase apresentou-se aumentada nos grupos Água e OM quando comparados ao grupo Normal, com tendência de diferença estatística ($p=0,055$ e $p=0,077$, respectivamente). As substâncias, por sua vez, promoveram

aumento da expressão desse gene. O AO promoveu aumento da expressão em relação ao grupo Normal. AU, por sua vez, promoveu aumento da expressão quando comparado aos grupos Água, OM e AO. Assim, pode-se dizer que no modelo do RH, o ácido ursólico promoveu aumento da expressão do gene que codifica para a HMG-CoA redutase, possivelmente contribuindo para o aumento de nódulos macroscópicos observados por ocasião do sacrifício dos animais desse grupo (**Tabela 2**).

5.5 Proliferação Celular

O método de Burton quantifica o DNA no tecido analisado, e com o mesmo é possível estimar-se relativamente a proliferação celular, uma vez que em um tecido em que as células estão em divisão, há uma maior porcentagem das mesmas na fase S (fase de síntese do DNA); logo, quanto maior a quantidade de células proliferando, maior a concentração de DNA (BURTON, 1956).

Por meio desta técnica, nota-se pela **Tabela 8** que todos os grupos submetidos ao modelo do RH apresentaram um aumento da concentração de DNA hepático quando comparado ao grupo Normal.

Todavia, o referido método bioquímico, além de ter sensibilidade limitada, não dá idéia da ocorrência de proliferações celulares em diferentes instâncias, tais como em LPN persistentes ou em remodelação.

Portanto, utilizou-se a técnica de dupla-marcação imunoistoquímica para BrdU e GST-p. Com ela, foi possível avaliar a contagem de hepatócitos proliferando tanto no tecido não pré-neoplásico como nas LPN, descriminando-se ainda entre as persistentes e as em remodelação. Além disso, os resultados apresentados na **Tabela 9** referem-se à contagem total de células em proliferação no corte histológico, marcadas por BrdU.

Digno de nota é a observação de que nos grupos controle Água e OM, a proliferação celular das LPN em remodelação é menor do que a encontrada para as LPN persistentes ($p < 0,05$). Essa taxa de proliferação celular menor observada nas LPN em remodelação pode estar associada ao seu desaparecimento progressivo, o

que foi confirmado com o cálculo do índice de crescimento ajustado (ICA), neste trabalho.

Observa-se que o ácido ursólico aumentou a proliferação celular das LPN em remodelação quando comparado ao grupo OM, mas o ácido oleanólico não apresentou esta capacidade. Todavia, esse aumento não afetou o ICA das LPN em remodelação do grupo OM.

Por outro lado, observou-se no grupo AU um número maior de nódulos macroscópicos em comparação ao grupo OM, o que pode estar relacionado ao aumento da proliferação celular observada nesse grupo.

5.6 Apoptose

Para identificar corpúsculos apoptóticos em cortes de fígado corados com hematoxilina e eosina (H&E) é proposta a utilização de critérios morfológicos (GRASL-KRAUPP et al., 1994). Nesse sentido, ao se realizar consulta mais aprofundada à literatura, constatou-se a existência de metodologia considerada mais sensível que a anteriormente proposta. Esta foi descrita por Stinchcombe et al. (1995) e se baseia na observação de que corpúsculos apoptóticos apresentam intensa fluorescência da eosina em cortes histológicos de fígado corados com H&E. De acordo com os autores, a intensa fluorescência dos corpúsculos apoptóticos permite que estes sejam identificados mais rapidamente por microscopia de fluorescência em comparação com o uso de luz transmitida normal. Além disso, o uso desta metodologia específica permite também localizar pequenos corpúsculos apoptóticos que, normalmente, não seriam identificados utilizando-se luz normal. Isto, segundo os autores, torna o método em questão cerca de 3 vezes mais sensível do que o convencionalmente utilizado e que emprega luz transmitida normal. Além disso, em caso de dúvida acerca da identidade da estrutura fluorescente, esta pode ser confirmada por critérios morfológicos clássicos (GRASL-KRAUPP et al., 1994), alternando-se o sistema para luz normal. É interessante ainda destacar que esta metodologia foi inicialmente descrita para avaliar a apoptose em lesões pré-neoplásicas hepáticas induzidas pela DEN em ratos Wistar, tendo sido

também utilizada especificamente no modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” (WOOD et al., 1999).

Dessa forma, decidiu-se também por utilizar essa metodologia para avaliar a apoptose nas condições experimentais do presente trabalho. Nesse sentido, a microscopia de fluorescência se mostrou bastante adequada para a identificação dos corpúsculos apoptóticos hepáticos. Ao longo da avaliação das lâminas contendo cortes de fígado em H&E, foi de fato possível se observar corpúsculos fluorescentes (**Figura 11**) de maior e menor tamanho conforme originalmente descrito por Stinchcombe et al. (1995).

A constatação mais importante a que se chega ao se observar **Tabela 10**, é o aumento do número de corpúsculos apoptóticos nas LPN em remodelação, em todos os grupos, quando comparados aos das LPN persistentes. Ainda assim, apesar do aumento considerável do número de corpúsculos apoptóticos nas LPN em remodelação, não há diferenças estatísticas nos grupos OM e AU, muito provavelmente devido aos grandes desvios numéricos obtidos. A este propósito, observou-se diferenças muito acentuadas no número de corpúsculos apoptóticos por mm² de corte histológico do fígado de cada animal, o que certamente contribuiu para a ausência de diferença estatisticamente significativa.

No entanto, mesmo não tendo atingido diferença estatística nesses grupos, deve-se considerar que o aumento da apoptose observada nas LPN em remodelação quando comparadas as LPN persistentes foi de 343% no grupo AO e de 258% no grupo AU.

Poderia-se sugerir, levando-se em conta apenas a apoptose, que as LPN em remodelação têm maior probabilidade de desaparecerem se comparadas ao tecido adjacente. Uma análise completa depende, todavia, de considerar-se a proliferação celular. Por esse motivo, foi calculado o índice de crescimento ajustado, discutido adiante.

Considerando-se os grupos AO e AU, observa-se que os triterpenóides aumentaram a apoptose apenas dentro das LPN em remodelação quando comparados ao grupo OM. Isto está de acordo com o que se observou à microscopia de LPN GST-p positivas, onde se constatou que esses triterpenóides promoveram uma diminuição do número médio e da área média das LPN em remodelação. Provavelmente, essas substâncias foram capazes de estimular a apoptose nas LPN em remodelação, mas não nas LPN persistentes, porque a via pela qual AO e AU

atuam estimulando a apoptose talvez esteja inibida ou diminuída nas LPN persistentes.

Nesse sentido, vários trabalhos descrevem que o ácido ursólico induz apoptose em cultura de células *in vitro* (HUANG et al., 1999, *apud* LIU, 1995; LAUTHIER et al., 2000; KIM et al., 2000), enquanto sugere-se que o seu mecanismo de ação envolva ativação de caspases e inibição de c-IAPs, sem alteração na expressão de p53 ou desbalanço entre bcl-2 e Bax (CHOI et al., 2000).

Sendo a apoptose regulada por proteínas tais como a p53, bcl-2 e caspases, pode-se supor que alterações nas mesmas, acompanhadas de perda de sua função, possam impedir que substâncias estimuladoras da apoptose atuem por essas vias. Portanto, se este for o caso dos triterpenóides alvo desse estudo, sua atividade quimiopreventiva associada à apoptose e descrita na literatura, estaria comprometida, sendo possível apenas nas LPN em que tais vias estivessem restituídas.

Os dados obtidos em relação à apoptose corroboram, portanto, o achado de que os ácidos oleanólico e ursólico determinaram alterações nas LPN em remodelação, sem atuar nas persistentes, em nossas condições experimentais.

5.7 Remodelação das LPN

Wood e colaboradores (1999) sugeriram que a remodelação de lesões pré-neoplásicas não ocorre por uma menor proliferação celular destas ou por um maior índice apoptótico. Segundo estes autores, a remodelação ocorre por mecanismos de rediferenciação celular. Neste sentido, observaram que hepatócitos dentro de lesões em remodelação deixam de expressar a enzima GST 7-7 e outras enzimas comuns às lesões pré-neoplásicas do fígado, também revertendo seu estado para o de células hepáticas normais.

Basicamente, o estudo comparou duas linhagens de ratos, a F344 e a Copenhagen (Cop), quanto às suas capacidades diferenciadas de remodelação de lesões pré-neoplásicas. Previamente, demonstraram que os ratos Cop são relativamente resistentes à indução de lesões positivas para a enzima glutational S-transferase 7-7 (GST 7-7 ou GST-p) submetidos a um protocolo modificado do

modelo de hepatocarcinogênese do hepatócito resistente. Para estudar com mais detalhe este fenômeno, grupos de animais submetidos ao modelo, tanto Cop quanto F344, foram sacrificados em diferentes instantes, a saber: 2, 4, 7, 14 e 21 dias após a hepatectomia parcial. Em todos estes instantes, foram avaliados os índices de marcação por BrdU, o índice apoptótico e a porcentagem de lesões em remodelação.

Quanto ao número de lesões positivas para GST 7-7, não foram encontradas diferenças entre as linhagens nos dias 2 e 4 após a hepatectomia. Porém, ao dia 14, ~29% das áreas dos fígados dos ratos F344 estavam ocupadas por LPN, enquanto que no mesmo período, apenas ~9% das áreas dos fígados dos ratos Cop apresentavam lesões. Mais adiante, ao dia 21, as lesões ocupavam ~58% do volume dos fígados dos ratos F344 e somente ~6% do volume do fígado dos ratos Cop.

A despeito destas diferenças, os índices de marcação por BrdU foram semelhantes para ambas as linhagens, tanto nas lesões quanto em tecidos adjacentes, indicando que a proliferação celular foi semelhante em ambas. Desta forma, os autores descartaram a hipótese de que os hepatócitos nas lesões dos ratos F344 tivessem um índice proliferativo maior do que o dos ratos Cop.

Também não encontraram diferenças significantes entre os índices de apoptose de ambas as linhagens em quaisquer dos instantes analisados, indicando assim que a menor porcentagem de lesões GST 7-7 positivas no fígado dos ratos Cop não se deveu a uma maior quantidade de células sofrendo apoptose.

Desta forma, os autores destacam como diferenças básicas a extensão de lesões remodelando e o padrão de resposta das células ovas no fígado dos ratos Cop após a hepatectomia. Estas tendências são ilustradas pelo fato de que, ao dia 14 após a hepatectomia, ~76% das lesões presentes no fígado dos ratos Cop mostraram evidências de remodelação, enquanto que a porcentagem era de ~14% para os F344. Quanto à resposta de células ovas, esta foi semelhante entre as linhagens ao dia 4; no entanto, ao dia 7, os F344 apresentaram uma extensiva migração destas células para o parênquima hepático. Com relação aos ratos Cop, estes apresentaram maior migração de células hepáticas nas regiões portais. Uma menor resposta de células ovas na linhagem Cop poderia estar envolvida na resistência relativa desta ao crescimento de lesões GST 7-7 positivas, segundo estes autores.

Apesar destes resultados, os próprios autores alegaram que a contagem de nódulos positivos nos ratos Cop poderia estar erroneamente aumentada em comparação com os F344; isto ocorreria porque o fígado dos ratos F344 apresentaram lesões extensas que tendiam a coalescer, de modo que duas ou mais lesões poderiam ter sido contadas como sendo apenas uma, o que levaria a uma subestimação do número de LPN individuais presentes nos ratos desta linhagem. Apesar dos possíveis erros nas estimativas de LPN por fígado, os ratos Cop são claramente suscetíveis à iniciação e talvez sejam mais suscetíveis do que os F344. Mesmo assim, a contagem de LPN foi semelhante em ambas as linhagem aos dias 2 e 4 após a hepatectomia.

Com relação à atividade mito-inibitória do 2-AAF, estes mesmos autores demonstraram que não há diferença significativa entre o grau de inibição de divisão celular de hepatócitos normais induzida por esta substância entre as duas linhagens de ratos. Ademais, o estudo em questão corroborou este achado a partir dos dados de marcação por BrdU, demonstrando mito-inibição semelhante entre hepatócitos normais de Cop e F344. Da mesma maneira, demonstraram que as LPN de ambas as linhagens respondem de maneira semelhante ao 2-AAF, ou seja, são igualmente resistentes aos seus efeitos mito-inibitórios.

O mecanismo pelo qual a remodelação ocorre, se melhor identificado, pode talvez vir a auxiliar na previsão e descoberta de substâncias capazes de aumentar a remodelação nas LPN, isto é, com maior capacidade quimiopreventiva.

Por este motivo, a análise da carcinogênese envolvendo a proliferação celular e a apoptose, feita no presente trabalho, é de grande importância para a melhor compreensão da remodelação. Aqui, como já descrito, fizemos a comparação entre proliferação e morte celular em animais da mesma linhagem (F344), e em LPN persistentes ou em remodelação. Isto certamente traz maior exatidão nos resultados obtidos, levando a considerações mais acuradas a respeito do fenômeno.

Por ocasião do presente trabalho, tivemos a oportunidade de aprofundar o conhecimento a respeito dos prováveis mecanismos pelos quais o fenômeno da remodelação ocorre. Tais informações são de grande importância, uma vez que a remodelação é o processo pelo qual uma Lesão Pré-Neoplásica é eliminada do organismo. Portanto, compreendido melhor, esse processo pode ajudar a explicar o mecanismo de ação das substâncias quimiopreventivas.

Nesse sentido, vale lembrar que o presente trabalho comparou tais parâmetros por meio de técnicas tais como a dupla-marcação para GST-p e BrdU e apoptose por fluorescência, dentro e fora de LPN persistentes ou em remodelação, fazendo-se a leitura de todo o corte histológico, e não apenas realizando uma contagem de índice de marcação.

De posse dessas informações, foi possível calcular o Índice de Crescimento Ajustado (ICA), dividindo-se o valor numérico da contagem de corpúsculos apoptóticos pelo valor numérico dos hepatócitos imunomarcados para BrdU (KONG e RINGER, 1996). Este ICA pode ser interpretado de acordo com seu valor, se menor ou maior que 1. Assim, sendo ele menor que 1, indica que o tecido em questão está proliferando. Se o mesmo for maior que 1, o tecido está regredindo.

Dessa forma, foi gerada a **Tabela 11**, onde se demonstra de forma clara a participação da proliferação e da apoptose na remodelação. Nessa Tabela, pode-se observar que os valores dos ICA do fígado dos ratos do grupo Normal, bem como do tecido não pré-neoplásico e das LPN persistentes esteve abaixo de 1, indicando que tais tecidos se encontravam em fase de crescimento populacional celular. O motivo para isto é que os ratos utilizados neste experimento pesavam cerca de 230g por ocasião de seu sacrifício e, como mostra a **Figura 5**, os mesmos estavam ainda em fase de ganho de peso.

As LPN em remodelação de todos os grupos submetidos ao modelo do RH, no entanto, apresentaram ICA acima de 1, o que significa dizer que as mesmas se encontravam em fase de declínio populacional celular, ou seja, de regressão.

A obtenção do ICA se mostrou importante no presente estudo, uma vez que a análise separada da imunomarcação por BrdU (proliferação celular, **Tabela 9**) ou da contagem de corpúsculos apoptóticos (apoptose, **Tabela 10**), pode não fornecer uma idéia clara do que ocorre nas LPN. No caso da quantificação de corpúsculos apoptóticos, por exemplo, apesar de poder-se observar um número médio elevado de corpúsculos por mm² nas LPN em remodelação dos grupos OM e AU, quando comparados às LPN persistentes, não há diferença estatística nesses casos, muito provavelmente devido ao desvio-padrão elevado dos mesmos. Assim, observando-se a **Tabela 11**, fica evidente a participação da apoptose e da proliferação celular no processo da remodelação, em todos os grupos submetidos ao modelo do RH.

Dessa forma, esses resultados são possivelmente mais exatos do que aqueles apresentados pelo grupo de Wood e colaboradores, visto que o mesmo

comparou a proliferação celular e a apoptose entre linhagens de ratos mais ou menos resistentes à carcinogênese, e o presente trabalho fez comparação entre LPN persistentes e em remodelação.

Tais resultados têm lógica dentro do contexto da carcinogênese em estudo, uma vez que se descreve que LPN em remodelação tendem a desaparecer. Assim, o presente trabalho utilizou técnicas que permitiram a contagem do número médio de hepatócitos imunomarcados para BrdU, onde se inferiu a proliferação celular, bem como a contagem do número médio de corpúsculos apoptóticos, dentro e fora de LPN persistentes ou em remodelação. Os resultados apontam fortemente a participação da proliferação celular e da apoptose como agentes necessários para o fenômeno da remodelação, bem como para o crescimento das LPN persistentes em nosso modelo de hepatocarcinogênese.

Portanto, o presente trabalho reforça e confirma a hipótese de Schulte-Herrmann e colaboradores a respeito da remodelação (SCHULTE-HERRMANN et al., 1997, 1995a, 1995b), sugerindo que uma proliferação celular diminuída, associada a uma alta taxa de apoptose, seja um importante mecanismo celular pelo qual as LPN são eliminadas durante a remodelação.

5.8 Danos no DNA

Descreve-se que o estresse oxidativo apresenta papel importante no processo de hepatocarcinogênese (SHIOTA et al., 2002). Nesse sentido, verificou-se já nas fases iniciais desse processo a ocorrência de intensa peroxidação lipídica (SARKAR et al., 1995), que poderia estar associada a uma inibição da expressão da enzima superóxido dismutase (BARTOLI et al., 1988). Além disso, em hepatomas induzidos em ratos com DEN, observou-se colapso geral do sistema enzimático antioxidante (BOITIER et al., 1995). Por serem capazes de danificar biomoléculas importantes como o DNA, espécies reativas de oxigênio (EROs) podem causar mutações em genes importantes tais como os supressores de tumor e/ou protooncogenes e, desta forma, estimular a formação de neoplasias (SHEN e ONG, 1996). Nesse contexto, destaca-se a importância do dano oxidativo do DNA na hepatocarcinogênese (UEMURA et al., 1996).

O método do cometa tem sido utilizado para avaliar *in vitro* e *in vivo* o dano no DNA, considerado um biomarcador do estado oxidativo. Dessa forma, este método se presta para avaliar quebras nas fitas de DNA e bases oxidadas decorrentes da ação de EROs (OLIVE et al., 1990; COLLINS, 2001; FAIRBAIRN et al., 1995; TOLEDO et al., 2003; ESPÍNDOLA et al., 2005).

Neste projeto, optou-se por corar os cometas formados com nitrato de prata devido às vantagens do método como, por exemplo, permitir o registro permanente do experimento e verificação independente dos resultados, bem como evitar problemas associados à fluorescência tais como o seu decaimento, no caso do uso do brometo de etídio. Além disso, a coloração com prata possibilita que os cometas sejam analisados utilizando-se simples microscópios de luz, ao invés de equipamentos caros e complexos como microscópios de fluorescência, e seus respectivos sistemas de análise de imagem (KIZZILIAN et al., 1999).

Logo de início, vale destacar que no sentido de se conferir maior confiabilidade analítica aos dados em questão, tomou-se a precaução de introduzir controles positivo e negativo representados, respectivamente, por amostras de fígado de ratos normais (não submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese ou a qualquer outro tratamento) tratados ou não com peróxido de hidrogênio. Nesse sentido, os resultados obtidos (**Tabela 12**) em relação a esses dois controles indicam que a metodologia utilizada se apresentou adequada ao permitir que se fizesse clara distinção entre amostras normais, em que os comprimentos dos cometas foi significativamente ($p < 0,05$) menor do que os cometas de amostras de fígado de ratos de todos os grupos experimentais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese, e amostras tratadas com peróxido de hidrogênio, em que, por outro lado, foram observados cometas maiores ($p < 0,05$) do que em todas as outras instâncias experimentais.

Como observado na **Tabela 12**, todos os grupos submetidos ao modelo do RH (Água, OM, AO e AU), apresentaram “cometas” de comprimento maior quando comparados ao grupo Normal. Esses dados são interessantes e sugerem que a ocorrência de danos no DNA, induzidas possivelmente por espécies reativas de oxigênio (EROs), por exemplo, represente evento precoce na hepatocarcinogênese. Desta forma, descreve-se que danos no DNA apresentam importante papel no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas hepáticas ao induzirem desequilíbrio entre proliferação celular (elevada) e apoptose (relativamente reduzida) no fígado

(JIA et al., 2002). Além disso, tanto a iniciação como a promoção, caracterizam-se por um estado oxidativo com grande potencial de ser modulado por agentes quimiopreventivos contra o câncer (NAKAE et al., 1997).

Por outro lado, a análise pelo método do “cometa” parece indicar que os ácidos oleanólico ($p < 0,05$) e ursólico ($p = 0,061$) induziram um aumento dos danos causado ao DNA, como pode ser observado na **Tabela 12**. Este aumento de danos no DNA, por sua vez, pode ter sido o gatilho a estimular um aumento da apoptose nas LPN em remodelação, visto que as células entram em processo de morte celular programada (**Tabela 10**) para impedir que os danos no DNA passem para as células filhas.

Portanto, aparentemente, AO e AU aumentaram os danos no DNA hepático e talvez estimularam a apoptose nas LPN em remodelação porque estas estavam em condição de responder a estímulos apoptóticos. Talvez isto esteja relacionado à observação de que os grupos AO e AU apresentaram número e área média de LPN em remodelação menores do que as obtidas no grupo OM (**Tabelas 4 e 5**). Todavia, como não distinguimos especificamente danos no DNA de LPN persistentes ou em remodelação, essa sugestão de mecanismo não pode ser aprofundada.

5.9 Expressão e Ativação de NF- κ B

Em relação à expressão de p65 (**Figura 15**), é interessante notar que os grupos submetidos ao modelo do RH apresentaram aumento de expressão quando comparados ao grupo Normal. Tal aumento foi observado também no grupo Água, indicando que este foi decorrente da hepatocarcinogênese em si, e não apenas do óleo de milho ou dos triterpenóides. A expressão aumentada de p65 observada nos grupos submetidos ao modelo do RH (Água, OM, AO e AU) poderia ser atribuída tanto a uma maior expressão do gene que codifica para p65 quanto a uma menor degradação de sua proteína em nível celular.

Tanto no grupo AO quanto AU observou-se aumento da expressão de p65 quando comparados ao grupo OM, com tendência de diferença estatística para o grupo AO ($p = 0,06$). A ausência de diferença estatística para o aumento da expressão de p65 no grupo AO é devida, provavelmente, ao elevado desvio

numérico obtido. O grupo AO apresentou aumento de 177% na expressão de p65 em relação ao grupo OM.

Este aumento da expressão de p65 por parte das substâncias sugere a participação de NF- κ B na hepatocarcinogênese, como observado no caso da ativação da proteína (western blot de extrato nuclear, **Figura 14**). Portanto, uma das razões para a ausência de quimioprevenção desses triterpenóides em nossas condições experimentais pode ser a expressão aumentada de p65 no fígado dos ratos entubados com os ácidos oleanólico e ursólico.

O NF- κ B é ativado em situações de estresse celular. Quando o estímulo à célula é crônico, como no caso da carcinogênese, há o aumento de sua expressão (KITAJIMA et al., 1992; HIGGINS et al., 1993; NAKSHATRI et al., 1997). Nesse sentido, talvez a condição patológica das LPN, onde as células apresentam danos em seu material genômico e há produção de radicais livres, tenha contribuído para um aumento da expressão de NF- κ B, na tentativa de acompanhar a ativação intensa e constante desse fator de transcrição.

Por outro lado, se o aumento da expressão de NF- κ B não tiver sido acompanhado pelo aumento da expressão de seu inibidor citoplasmático, o I κ B, pode-se supor que o aumento de expressão de NF- κ B, não sendo inibido, talvez tenha passado para o núcleo, resultando daí a sua ativação elevada.

Sabe-se que o aumento da expressão de I κ B, induzido por vetor de expressão em células neoplásicas, onde a ativação de NF- κ B era intensa, foi capaz de inibir a passagem desse fator de transcrição para o núcleo (BEG et al., 1992; BEG et al., 1993). Portanto, o inibidor I κ B tem um papel fundamental no controle de NF- κ B, e um desbalanço entre suas expressões pode talvez ter levado ao aumento exacerbado da ativação de NF- κ B, observada em nosso experimento.

Considerando-se a presença de p65 nas frações citoplasmáticas das células, como demonstrado na **Figura 16**, o padrão é o mesmo encontrado para a expressão total da proteína. Observa-se na fração celular citoplasmática dos grupos submetidos ao modelo do RH um aumento de p65 quando comparados ao grupo Normal, acompanhando o aumento da expressão de p65, observado nos grupos submetidos à carcinogênese.

Estando o fator de transcrição NF- κ B normalmente inativo na porção citoplasmática da célula, sendo translocado para o núcleo apenas quando da sua

ativação (DELGADO et al., 1999, VISCONTI et al., 1997; BOURS et al., 1994; LIU et al., 2002), a análise de sua presença nos núcleos de hepatócitos do fígado de ratos dos diferentes grupos experimentais pôde trazer alguma informação a respeito do seu comportamento no modelo experimental, com e sem a presença dos triterpenóides ácidos oleanólico e ursólico.

O fator de transcrição NF- κ B pode ser formado, mais comumente, por heterodímeros das proteínas p65 e p50, podendo também ocorrer como homodímeros de p65 ou de p50. Além dessas, outras proteínas foram descritas fazendo parte do fator de transcrição. Apesar disso, considera-se que o p65 seja o principal responsável pelas atividades biológicas de NF- κ B, e que dímeros de p50 funcionariam inibindo a expressão genética, ao invés de agir como um fator de transcrição. Assim, pode-se tomar a presença de p65 no núcleo de qualquer célula como ativação de NF- κ B. Alguns trabalhos avaliam, inclusive, apenas p65 e o tomam por NF- κ B (CARRASCO-LEGLEU et al., 2004; ESPÍNDOLA et al., 2005). Por este motivo, na presente discussão, a ativação de p65 foi considerada como a do fator de transcrição.

Com base nos dados obtidos por meio da técnica de western blot, que se prestou a avaliar a ativação de NF- κ B, pode-se chegar a algumas conclusões a respeito da presença de p65 no núcleo dos hepatócitos dos diferentes grupos de ratos submetidos ao modelo do RH.

Sendo relativamente extensa a literatura que demonstra ser este fator de transcrição importante para a carcinogênese, nossos dados reforçam tal premissa e avançam no sentido de sugerir sua participação em uma fase inicial do processo carcinogênico, a saber, na promoção.

Com relação às substâncias em estudo, observa-se um aumento da presença de p65 nos núcleos de hepatócitos dos ratos aos quais se administrou os dois triterpenóides, sendo, inclusive, este aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle entubado tão somente com óleo de milho, o veículo dos mesmos (grupo OM). Portanto, pode-se dizer que tanto o ácido oleanólico quanto o ursólico aumentaram a ativação de p65 neste modelo, em relação ao grupo controle OM.

Este achado está de acordo com dois trabalhos de 2001, ambos do mesmo grupo de pesquisadores (CHOI et al. e YOU et al., 2001), nos quais foram avaliados

os efeitos de ácido oleanólico e ursólico, respectivamente, na ativação de NF- κ B em macrófagos. Em ambos os casos foi observado um aumento da ativação desse fator de transcrição devido ao tratamento com os triterpenóides. De maneira semelhante, o mesmo pode ter ocorrido no fígado dos animais submetidos ao modelo do RH e entubados com as substâncias em estudo, levando ao aumento observado da ativação de NF- κ B. Portanto, tal ativação pode ter, inclusive, participado da ausência de atividade quimiopreventiva por parte de AO, e estar envolvida ao aumento de LPN macroscópicas observadas no grupo AU.

Segundo Rusyn e colaboradores (1999), o óleo de milho foi capaz de estimular a ativação de NF- κ B em fígado de ratos entubados com uma única dose de 2,0 mL/Kg de peso corpóreo, atingindo um pico de estimulação em 8 horas, e que decai a níveis basais em cerca de 36 horas. Baseados nesse conhecimento, introduziu-se também no presente estudo o grupo controle Água, com o qual pode-se agora afirmar que a ativação de NF- κ B observada em nossas condições experimentais não se deu puramente por causa do veículo óleo de milho, mas sim, foi estimulada pela própria carcinogênese.

Por outro lado, a maior ativação de NF- κ B por parte dos ácidos oleanólico e ursólico, nas condições experimentais do presente trabalho, talvez possa estar relacionada ao aumento dos danos no DNA, como observado pelo comprimento dos "cometas" (**Tabela 12**). Assim, sendo o NF- κ B um biomarcador de estresse celular, o aumento do estado oxidativo nos hepatócitos dos grupos AO e AU pode ter estimulado ainda mais sua ativação.

Dessa forma, foi observado que os ácidos oleanólico e ursólico não apresentaram atividade quimiopreventiva no modelo do RH, nas condições experimentais do presente trabalho. No grupo AU, porém, observou-se um aumento do número e tamanho médios das LPN macroscópicas, apesar da ausência de diferença estatística. O aumento da expressão e da ativação de NF- κ B talvez possa estar relacionado com essas observações.

5.10 Acúmulo de p53 Citoplasmática em LPN

A presença da proteína p53 na célula é regulada por degradação citoplasmática, e está em concentrações não detectáveis no núcleo, em condições normais. A sua translocação para o núcleo acontece em resposta a algum estresse celular, como danos causados ao DNA, por exemplo. Nesses casos, a proteína torna-se transitoriamente estável e é translocada para o núcleo, onde exerce sua atividade. Este importante fator de transcrição está relacionado ao bloqueio da divisão celular e estímulo da apoptose, garantindo que uma possível mutação não seja herdada por células filhas (FABBRO e HENDERSON, 2003). O acúmulo de p53 na fração citoplasmática da célula, porém, é considerado um indicativo de estado patológico. Assim, o acúmulo de p53 no citoplasma tem sido intimamente relacionado a uma falha na diferenciação e aumento da malignidade em hepatocarcinomas (HEINZE et al., 1999), neuroblastomas (MOLL et al, 1995), e em outras neoplasias (NIKOLAEV et al., 2003).

Assim, tendo sido observado o acúmulo de p53 no citoplasma dos hepatócitos de LPN, sobretudo naquelas consideradas persistentes, como se observa na **Figura 19**, pode-se supor que tal acúmulo seja um indicativo do estado patológico dessas LPN, sendo mais comum nas persistentes, e menos frequente nas lesões em remodelação. Portanto, pode-se sugerir que as características peculiares da persistência dessas lesões possam estar envolvidas, em parte, com a perda da função de p53 que acompanha o seu acúmulo no citoplasma.

Ao observar-se apenas as LPN p53 positivas, pode-se notar que a proporção entre LPN persistentes e em remodelação com acúmulo citoplasmático de p53 se mantém relativamente constante entre os diferentes grupos submetidos ao modelo do RH (**Figura 20**). Assim, considerando-se as LPN p53 positivas, entre 66% e 77% eram persistentes, enquanto as LPN em remodelação se mantiveram entre 22% e 33%.

Essa informação tem consistência com o que se sabe a respeito de p53 que, sendo uma proteína chave que regula processos como proliferação celular e apoptose, seu funcionamento normal, ou seja, sem acúmulo citoplasmático, deve garantir que os hepatócitos de uma LPN em remodelação sejam gradativamente eliminados pela morte celular programada, com concomitante diminuição da proliferação celular.

Nesse sentido, também foi observado no presente trabalho que a proliferação celular e a apoptose parecem estar bastante relacionados ao fenômeno da

remodelação, como fica claro ao observar-se o Índice de Crescimento Ajustado (**Tabela 11**). Neste índice, pode-se observar como a apoptose tem preponderância sobre a proliferação celular nas LPN em remodelação, em todos os grupos submetidos ao modelo do RH, o que pode explicar a regressão dessas lesões.

Pode-se sugerir que tanto a diminuição da proliferação celular quanto o aumento da taxa de apoptose nas LPN em remodelação se deve a uma capacidade de atuação por parte de p53. Ainda há que se considerar que as células das LPN de uma maneira geral apresentam modificações patológicas que levam a crer na presença de muitos danos em seu material genético. Portanto, considerando-se a p53 um “guardião do genoma”, sua atividade em LPN em remodelação pode ser a responsável pelo elevado ICA dessas lesões.

Por outro lado, o acúmulo citoplasmático de p53, observado em sua maior parte nas LPN persistentes de todos os grupos submetidos ao modelo do RH, pode estar relacionado ao Índice de Crescimento Ajustado menor do que 1 dessas lesões.

5.11 Aumento da Expressão de bcl-2 e Acúmulo Citoplasmático de p53

A bcl-2 é uma proteína anti-apoptótica. Está presente normalmente nas células, onde desempenha seu papel fisiológico. O aumento de sua expressão, por outro lado, pode estar relacionado a estados patológicos, e foi observado em cânceres e tecidos pré-neoplásicos (CHRISTENSEN et al., 1999).

No presente trabalho constatou-se um aumento da expressão de bcl-2 em uma porcentagem de LPN e, dentre essas, a maior parte é constituída de LPN persistentes (**Tabela 16**). Esses dados indicam que há um descontrole da expressão dessa proteína anti-apoptótica em LPN e que, nestas, as persistentes são as mais afetadas, como era de se esperar.

Digno de nota é o fato de que a porcentagem de LPN, persistentes ou em remodelação, com aumento de expressão de bcl-2 é quase a mesma porcentagem de LPN persistentes e em remodelação com marcação citoplasmática de p53, em todos os grupos submetidos ao modelo do RH, como pode ser constatado nas Tabelas 14 e 16. De fato, foi observado no presente trabalho que as LPN com

acúmulo de p53 no citoplasma eram, em sua maior parte, as mesmas que apresentavam aumento de expressão de bcl-2.

Nesse sentido, Van Gijssel e colaboradores (2000), estimularam a ativação de p53 em ratos submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente (RH) por meio de radiação. Posteriormente, avaliou-se a presença de p53 e bcl-2 em cortes histológicos.

Foi observado que os hepatócitos do tecido ao redor das lesões (*surrounding*), apresentava intensa marcação nuclear para p53, enquanto que os focos GST7-7+ não apresentam marcação nuclear, e sim citoplasmática.

Segundo sugerido pelo grupo de pesquisadores, a expressão elevada de bcl-2 pode estar associada ao acúmulo de p53 no citoplasma. Nesse sentido, nosso trabalho está de acordo com o sugerido, uma vez que constatamos uma simultaneidade de eventos entre bcl-2 e p53 (VAN GIJSSEL et al., 2000).

5.12 Ativação de p65 Hepático e Acúmulo de p53 no Citoplasma

Descreve-se que os fatores de transcrição NF- κ B e p53 competem pelos mesmos cofatores no núcleo celular para exercerem suas atividades peculiares. Enquanto a p53 agiria estimulando a apoptose de células nas quais a morte celular é uma necessidade, o NF- κ B a inibiria. Logo, de maneira simplificada pode-se dizer que ambas possuem atividades opostas em relação ao destino da célula.

No presente trabalho não foi avaliada a ativação de p65 em LPN persistentes ou em remodelação, de modo que não se pode afirmar se NF- κ B estaria ativado ou não em LPN em remodelação. Porém, constatou-se que os tecidos hepáticos dos grupos submetidos ao modelo do RH, de uma maneira geral, apresentavam ativação de p65 (**Figura 14**). Ao mesmo tempo, foi constatado que a maior parte das LPN com marcação citoplasmática para p53 eram LPN persistentes (**Tabela 14**).

Baseando-se nessas observações, há de se considerar que talvez o NF- κ B tenha dominado o quadro geral de eventos celulares na maior parte das LPN persistentes, uma vez que possivelmente se encontrava em maior concentração no núcleo do que a p53. Assim, o NF- κ B teria vantagem na competição com os

coativadores (p300 e CREB-binding protein), levando a célula a uma relativa resistência à apoptose (WEBSTER e PERKINS, 1999).

Portanto, estes fatores somados talvez possam ter contribuído para o ICA menor do que 1 observado em LPN persistentes, considerando-se que as mesmas apresentaram uma porcentagem elevada de marcação citoplasmática para p53. Nas LPN em remodelação, ao contrário, existindo uma porcentagem menor de marcação de p53 citoplasmático, tenderiam a contrabalançar uma ativação de NF- κ B, podendo suas células sofrerem apoptose em taxas mais elevadas do que a capacidade de proliferarem, como de fato se observou, e de acordo com Schulte-Hermann e colaboradores (1990).

5.13 Originalidade do Trabalho

Deve-se ressaltar aqui que o presente trabalho tem a sua originalidade, sobretudo no que se refere às descobertas a respeito da remodelação. Nesse sentido, poucos são os grupos de pesquisa que estudam o fenômeno da remodelação em LPN, e o conhecimento até agora obtido não permite explicá-lo de maneira satisfatória.

Assim, observamos que o índice de crescimento ajustado dessas lesões indica que uma diminuição da proliferação celular e concomitante aumento da apoptose estão relacionados com o desaparecimento de LPN em remodelação.

Também foi observado no presente trabalho que uma porcentagem das LPN apresenta acúmulo de p53 no citoplasma, como outros pesquisadores já haviam relatado (VAN GIJSSEL et al., 2000). Porém, o presente avança no sentido de relacionar esse acúmulo de p53 citoplasmático com LPN persistentes ou em remodelação, relatando que a maior parte das LPN imunomarcadas para p53 são as persistentes. O acúmulo de p53 no citoplasma, pode, então, estar envolvido com a característica persistente dessas lesões.

O mesmo pode ser dito em relação ao aumento de expressão de bcl-2 observado em LPN (CHRISTENSEN et al., 1999). Apesar de não ser novo o conceito de que a expressão desta proteína anti-apoptótica possa estar aumentada

em células pré-neoplásicas, no presente trabalho demonstrou-se que esse aumento de expressão pode estar envolvido com as LPN persistentes.

Deve ser ressaltado, também, que todos os resultados obtidos com o presente trabalho têm uma mesma direção em termos de lógica científica, não encontrando discrepâncias que poderiam colocar em dúvida alguns de seus achados. Dados como a proliferação celular, apoptose, ICA, ativação e expressão de NF- κ B, acúmulo de p53 citoplasmático e aumento de expressão de bcl-2 vão para um mesmo caminho, reforçando a participação desses fenômenos na hepatocarcinogênese.

Portanto, esses conhecimentos contribuem para um melhor entendimento da remodelação e da própria carcinogênese, somando-se ao que a ciência já conhece.

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões a que se pode chegar neste trabalho são:

- Os ácidos oleanólico e ursólico não apresentaram atividade quimiopreventiva, evidenciada pela análise macroscópica do número de nódulos e pela microscopia de LPN GST-p positivas, quando administrados continuamente durante oito (8) semanas consecutivas, na dose diária de 8mg/100g de peso corpóreo, em período compreendendo consecutivamente as etapas de iniciação e promoção inicial, em ratos F344 submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. O ácido ursólico, por sua vez, tendeu a aumentar o número de nódulos macroscópicos hepáticos, o que sugere, talvez, que este apresente uma atividade promotora.
- Os ácidos oleanólico e ursólico promoveram aumento da apoptose apenas nas LPN em remodelação, o que pode ter contribuído para a diminuição do número e da área média dessas LPN em remodelação.
- O aumento da expressão do gene que codifica para a enzima HMG-CoA redutase no fígado dos ratos submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" pode estar envolvido com a carcinogênese.
- O aumento da expressão do gene que codifica para a enzima HMG-CoA redutase no fígado de ratos entubados com ácido ursólico pode estar envolvido com a ausência de quimioprevenção por parte dessa substância e, talvez, com seus efeitos promotores em nódulos de hepatócitos observados à macroscopia.
- Os ácidos oleanólico e o ursólico contribuíram para com o aumento de danos no DNA hepático de ratos F344 tratados submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH, o que pode estar relacionado à ausência de quimioprevenção por parte desses triterpenóides.

-
- O aumento da expressão e da ativação do fator de transcrição NF- κ B no tecido hepático dos grupos Água e OM parece estar relacionado à carcinogênese.
 - O aumento da expressão e da ativação de NF- κ B em tecido hepático de ratos F344 pelos ácidos oleanólico e ursólico pode, talvez, estar relacionado à ausência de quimioprevenção por parte dessas substâncias.
 - A diminuição da proliferação celular e o aumento da apoptose em LPN em remodelação, parecem estar envolvidos com o fenômeno da remodelação, conforme observado pelo índice de crescimento ajustado.
 - O acúmulo da proteína supressora de tumor p53 no citoplasma, bem como o acúmulo da proteína anti-apoptótica bcl-2 nos hepatócitos, parece estar mais relacionado às LPN persistentes e, possivelmente, ao seu fenótipo mais agressivo do que com as LPN em remodelação e suas características.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, D. S., GARCIA, D. J. An overview of clinical cancer chemoprevention studies with emphasis on positive phase III studies. **J. Nutr.**, v. 125, p. 692s-7s, 1995.
- AMES, B. N., GOLD, L. S., WILLETT, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V. 92, P. 5258-65, 1995.
- ARNOLD, J. T., WILKINSON, B. P., SHARMA, S., STEELE, V. E. Evaluation of chemopreventive agents in different mechanistic classes using a rat tracheal epithelial cell culture transformation assay. **Cancer Res.**, v. 55, p. 537-43, 1995.
- BACH, T. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants- A review. **Lipids**, v. 30, p.191-202, 1995.
- BALDWIN, A. S. The NF- κ B and I- κ B proteins: new discoveries and insights. **Annu. Ver. Immunol.** 14, 649-681. 1996.
- BANNASCH, P. e ZERBAN, H. Tumors of the liver. In: **Pathology of Tumors in Laboratory Animals**. V. S. Turusov, U. Mohr, Eds. Lyon, IARC Cientific Publications No.99, v.1, p.199-240, 1990.
- BANNASCH, P. Pre-neoplastic lesions as end points in carcinogenesis testing. I. Hepatic Preneoplasia. **Carcinogenesis**, v.7, p.689-95, 1986.
- BANNASCH, P., HAERTEL, T., SU, Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. **Toxicol Pathol.**, v. 31, p. 134-139, 2003.
- BANNASCH, P., NEHRBASS, D., KOPP-SCHNEIDER, A. Significance of hepatic preneoplasia for cancer chemoprevention. **IARC Sci. Publ.**, v. 154, p. 223-240, 2001.
- BARTOLI, G. M., GIANNATTASIO, B., PALOZZA, P., CITTADINI, A. Superoxide dismutase depletion and lipid peroxidation in rat liver microsomal membranes: correlation with liver carcinogenesis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 966, p.214-221, 1988.
- BEAUPARLANT, P., KWAN, I., BITAR, R., CHOU, P., KOROMILAS, A. E., SONENBERG N, HISCOTT J. Disruption of I kappa B alpha regulation by antisense RNA expression leads to malignant transformation. **Oncogene**. v. 9(11), p. 3189-97, 1994.
- BEG, A. A., FINCO, T. S., NANTERMET, P. V., AND BALDWIN, A. S., JR. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I κ B: a mechanism for NF- κ B activation. **Mol. Cell. Biol.** v. 13, p. 3301-3310, 1993.
- BEG, A. A., RUBEN, S. M. , SCHEINMAN, R. I., HASKILL, S., ROSEN, C. A., BALDWIN, A. S. JR. I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. **Genes Dev.** v. 6(10), p.1899-913, 1992.

- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects Med.**, v. 21, p. 167-223, 2000.
- BOITIER, E., MERAD-BOUDIA, M., GUGUEN-GUILLOUZO, C., DEFER, N., CEBALLOS-PICOT, I., et al. Impairment of the mitochondrial respiratory chain activity in diethylnitrosamine-induced rat hepatomas: possible involvement of oxygen free radicals. **Cancer Res.**, v.55, p. 3028-3035, 1995.
- BOONE, C. W., KELLLOFF, G. J., MALONE, W. E. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. **Cancer Res.**, v. 50, p. 2-9, 1990.
- BOURS, V., DEJARDIN, E., GOUJON-LETAWE, F., MERVILLE, M-P., CASTRONOVO, V., The NF- κ B transcription factor and cancer: high expression of NF- κ B and I κ B-related proteins in tumor cell lines. **Biochemical Pharmacology**. v. 47, p. 145-149, 1994.
- BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. Suppression of 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7306-14, 1974.
- BURSCH, W., GRASL-KRAUPP, B., ELLINGER, A., TOROK, L., KIENZL, L.H., MULLAUER, L., SCHULTE-HERMANN, R. Active cell death: role in hepatocarcinogenesis and subtypes. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 72, p. 669-75, 1994.
- BURTON, K. A Study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. **Biochem. J.**, v. 62, p. 315-23, 1956.
- CABANNES, E., KHAN, G., AILLET, F., JARRETT, R. F., HAY, R. T. Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . **Oncogene**. v. 18(20), p. 3063-70. 1999.
- CARRASCO-LEGLEU, C. E., MARQUEZ-ROSADO, L., FATTEL-FAZENDA, S., ARCE-POPOCA, E., PEREZ-CARREON, J. I., VILLA-TREVINO, S. Chemoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester on promotion in a medium-term rat hepatocarcinogenesis assay. **Int. J. Cancer**, v. 108, p. 488-492, 2004.
- CHEN, C. J., YU, M. W., LIAW, Y. F. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 12, p. S294-S308, 1997.
- CHEN, C. P. E WANG, H. Y. The effects of oleanolic acid and dimethyl dicarbonate biphenyls on acute liver injury. **Zhong Cheng Yao Study** 10, 11(S)- 14(S)1331. 1989.
- CHOI, C. Y., YOU, H. J., JEONG, H. G. Nitric oxide and tumor necrosis factor- α production by oleanolic acid via nuclear factor- κ B activation in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 19, p. 49-55, 2001.
- CHOI, Y. H., BAEK, J. H., YOO, M., CHUNG, H., KIM, N. D. AND KIM, K. Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. **Int J Oncol**. v. 17(3), p. 565-71, 2000.

- CHRISTENSEN, J. G., GONZALES, A. J., CATTLEY, R. C., GOLDSWORTHY, T. L. Regulation of apoptosis in mouse hepatocytes and alteration of apoptosis by nongenotoxic carcinogens. **Cell Growth Differ.** v. 9(9), p. 815-25, 1998.
- CHRISTENSEN, J. G., ROMACH, E. H., HEALY, L. N., GONZALES, A. J., ANDERSON, S. P., MALARKEY, D. E., CORTON, J. C., FOX, T. R., CATTLEY, R. C., GOLDSWORTHY, T. L. Altered bcl-2 family expression during non-genotoxic hepatocarcinogenesis in mice. **Carcinogenesis.** v. 20(8), p. 1583-90, 1999.
- CHU, Z. L., MCKINSEY, T. A., LIU, L., GENTRY, J. J., MALIM, M. H. AND BALLARD, D. W. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 94(19), p. 10057-62, 1997.
- CLEGG, R. J., MIDDLETON, B., BELL, G. D., WHITE, D. A. The mechanisms of cyclic monoterpene inhibition of 3-hydroxi-3methylglutaryl coenzyme A reductase *in vivo* in the rat. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p.2294-99, 1982.
- COLEMAN, P. S., LAVIETES, B. B. Membrane cholesterol, tumorigenesis and the biochemical phenotype of neoplasia. **CRC Crit. Ver. Biochem.**, v. 11, p. 341-93, 1981.
- COLLINS, A.R., HORVÁTHOVÁ, E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 29, p. 337-341, 2001.
- COLUMBANO, A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes *in vivo*. **J. Cell. Biochem.**, v.58, p.181-90, 1995.
- COMMITTEE ON DIET, NUTRITION AND CANCER: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Washington D. C., **National Academy Press**, p. 478, 1982.
- CONI P, PICHIRI-CONI G, CURTO M, SIMBULA G, GIACOMINI L, SARMA DS, LEDDA-COLUMBANO GM, COLUMBANO A. Different effects of regenerative and direct mitogenic stimuli on the growth of initiated cells in the resistant hepatocyte model. **Jpn J Cancer Res.** v. 84(5), p. 501-7. 1993.
- COURTOIS, G., WHITESIDE, S.T., SIBLEY, C.H., ISRAEL, A. Characterization of a mutant cell line that does not activate NF-kappaB in response to multiple stimuli. **Mol. Cell. Biol.** v. 17(3), p. 1441-9. 1997.
- CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J. Nutr.**, v.129, p.775S-78S, 1999.
- CROWELL, P., CHANG, R. R., REN, Z., ELSON, C. E., GOULD, M. N. Selective inhibition of isoprenylation of 21-26- kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p.17679-85, 1991.
- DAGLI, M. L. Z., GUERRA, J. L., SINHORINI, I. L., WU, T. -S., RIZZI, M. B. S. L., PENTEADO, M. V. C., MORENO, F. S. β -Carotene reduces the ductular cell reaction in the liver of Wistar rats submitted to the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. **Pathology.** v. 30(3), p. 259-66. 1998.

- DE MIGLIO, M. R., SÍMILE, M. M., MURONI, M. R., CALVISI, D. F., VIRDIS, P., ASARA, G., FRAU, M., BOSINCO, G. M., SEDDAIU, M. A., DAINO, L., FEO, F., PASCALE, R. M. Phenotypic reversion of rat neoplastic liver nodules is under genetic control. **Int J Cancer**. v. 20;105(1), p. 70-5, 2003.
- DELGADO, M., GANEA, D. Vasactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit interleukin-12 transcription by regulating Nuclear Factor κ B and Ets activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274 (45), p. 31930-31940, 1999.
- DENDA, A., KITAYAMA, W., KONISHI, Y., YAN, Y., FUKAMACHI, Y., MIURA, M., GOTOH, S., IKEMURA, K., ABE, T., HIGASHI, T., HIGASHI, K. Genetic properties for the suppression of development of putative preneoplastic glutathione S-transferase placental form-positive foci in the liver of carcinogen-resistant DRH strain rats. **Cancer Lett**. v. 140(1-2), p. 59-67, 1999.
- DESSÍ, S., CHIODINO, C., BATETTA, B., ARMENI, M., MULAS, M. F., PANI, P. Comparative effects of insulin and refeeding on DNA synthesis, HMP shunt and cholesterologenesis in diabetic and fasted rats. **Pathology**, v. 20, p. 53-7, 1988.
- DESSÍ, S., CHIODINO, C., BATETTA, B., FADDA, A. M., ANCHISI, C., PANI, P. Hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase, cholesterologenesis, and serum lipoproteins in liver regeneration after partial hepatectomy. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 44, 169-76, 1986.
- DEVEREUX, T. R., RISINGER, J. I., BARRET, J. C. Mutation and altered expression of the human cancer genes: what they tell us about causes. **IARC Sci. Publ.**, v. 146, p. 19-42, 1999.
- DIPPLE, A. DNA adducts of chemical carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 16, p.437-441, 1995.
- DOLL, R. Strategy for detection of cancer hazards to man. **Nature**, v. 265, p. 589-96, 1977.
- DOLL, R. The lessons of life: Keynote address of the nutrition and cancer conference. **Cancer Res.**, v. 52, p.2024s-29s, 1992.
- DOLL, R., PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 66, p1191-308, 1981.
- DOMINIC, Y. A. AND SUBBAIYAN, M. Studies on mitochondrial lipid peroxidation in tumor-bearing rats treated with ursolic acid and ursolic acetate. **Medical Science Research** v. 21, p. 213-215. 1993.
- DRAGSTED, L. O., STRUBE, M., LARSEN, J. C. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. **Pharmacol Toxicol.**, v. 72, p. 116s-35s, 1993.
- DUCKETT, C. S., PERKINS, N. D., KOWALIK, T. F., SCHMID, R. M., HUANG, E. S., BALDWIN, A. S., NABEL, G. J. Dimerization of NF- κ B2 with RelA(p65) regulates DNA

- binding, transcriptional activation, and inhibition by an I kappa B-alpha (MAD-3). **Mol. Cell. Biol.** v. 13(3), p. 1315-22, 1993.
- EL-BAYOUMY, K., CHUNG, F. L., RICHIE, J. JR., REDDY, B. S., COHEN, L., WEISBURGER, J., WYNDER, E. L. Dietary control of cancer. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 216, p. 211-23, 1997.
- ELSON, C. E. Supression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: Protective roles in cancer and cardiovascular disease. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1666s-72s, 1995.
- ELSON, C. E., PEFFLEY, D. M., HENTOSH, P., MO, H. Isoprenoid –mediated inhibition of mevalonate synthesis: Potential application to cancer. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.221, p.294-311, 1999.
- ELSON, C. E., YU, S. G. The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables. **J. Nutr.**, v.124, p. 607-14, 1994.
- ESPÍNDOLA, R. M., MAZZANTINI, R. P., ONG, T. P., DE CONTI, A., HEIDOR, R., MORENO, F. S. 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(6), p. 1091-9, 2005.
- EVANS, H. J. Molecular genetic aspects of human cancers: the 1993 Frank Rose Lecture. **Br J Cancer**. v. 68(6), p. 1051-60, 1993.
- FABBRO, M., HENDERSON, B.R. – Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. **Exp. Cell Res.**, v. 282, p. 59-69, 2003.
- FAIRBAIRN, D., OLIVE, P. L., O'NEILL, K. L. O. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Res.**, v. 339, p. 37-59, 1995.
- FARBER, E. Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals. **Cancer Res.**, v. 44, p. 5463-74, 1984.
- FARBER, E. Clonal adaptation during carcinogenesis. **Biochem. Pharmacol.**, v. 39, p. 1837-1846, 1990.
- FARBER, E. Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. **Cancer Res.**, v. 55, p. 3759-62, 1995.
- FARBER, E., CHEN, Z. -Y., HARRIS, L., LEE, G., RINAUDO, J. S., ROOMI, W. M., ROTSTEIN, J., SEMPLE, E. The biochemical-molecular pathology of the stepwise development of liver cancer: new insights and problems. In: **Liver Cell Carcinoma. Falk Symposium** 51. P. BANNASCH, D. KEPPLER, G. WEBER, eds. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 273-91, 1988.
- FARBER, E., RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. **Cancer Res**, v. 51, p. 2751-2761, 1991.

- FARBER, E., SARMA, D. S. R. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Lab. Invest.**, v. 56, p. 4-22, 1987.
- FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, v. 181-182, p. 411-416, 2002.
- FERLAY, J.; BRAY, F.; PISANI, P.; PARKIN, D. M. Globocan 2000: **Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide**, version 1.0 IARC CancerBase n°5, 2001.
- FILHO, G. B. *Bogliolo patologia geral*. 2.ed Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998, 312p.
- FINCO, T. S., WESTWICK, J.K., NORRIS, J. L., BEG, A.A., DER, C.J., BALDWIN, A. S. Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF-kappaB transcriptional activity, which is required for cellular transformation. **J. Biol. Chem.** v. 272(39), p. 24113-6. 1997.
- FITCH, M. E., MANGELS, A. R., ALTMANN, W. A., EL HAWRY, M., QURESHI, A. A., ELSON, C. E. Microbiological screening of mevalonate-suppressive minor plant constituents. **J. Agric. Food. Chem.**, v.37, p.687-91, 1989.
- FUHRMAN, B., ELIS, A., AVIRAM, M. Hypocholesterolemic effect of lycopene and β -carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.233, p.658-662, 1997.
- GAN, K. H., LIN, C. N. Studies on the constituents of Formosan gentianaceous plants. XI. Constituents of *Gentiana flavo-maculata* and *Tripterospermum taiwanense* and the antihepatotoxic activity of ursolic acid derivatives. **Chinese Pharmaceutical Journal**. v. 40, p. 77-84, 1988.
- GHOSH, S., MAY, M. J., KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu Rev Immunol**. v. 16, p. 225-60, 1998.
- GILMORE, T. D., KOEDOOD, M., PIFFAT, K. A., WHITE, D. W. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. **Oncogene**. v. 13(7), p. 1367-78, 1996.
- GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v.343, p.425-30, 1990.
- GOLDSTEIN, J. L., HELGELSON, J. A. S., BROWN, M. S. Inhibition of cholesterol synthesis with compactin renders growth of cultured cells dependent on the low density lipoprotein receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 5403-9, 1979.
- GOLDSWORTHY, T. L., FRANSSON-STEEN, R., MARONPOT, R. R. Importance of and approaches to quantification of hepatocyte apoptosis. **Toxicol. Pathol.**, v. 24, p. 24-35, 1996.
- GOULD, M. N. Prevention and therapy of mammary cancer by monoterpenes. **J. Cell. Biochem.**, v.22, p. 139S-144S, 1995.
- GRASL-KRAUPP, B., BURSCH, W., RUTTKAY-NEDECKY, B., WAGNER, A., LAUER, B., SHULTE-HERRMANN, R. Food restriction eliminates preneoplastic cells through

- apptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 9995-9, 1994.
- GREAVES, M. Cancer causation: the darwian downside of past success. **Lancet Oncol.**, v. 3, p. 244-251, 2002.
- HABENICHT, A. J. R., GLOMSET, J. A., ROSS, R. R. Relation of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and Swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. **J. Biol. Chem.**, v. 225, p. 5134-40, 1980.
- HAENSZEL, W., KURIHARA, M. Studies of Japanese Migrants. I Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.40, p. 43-68, 1968.
- HAENSZEL, W., KURIHARA, M., SEGI, M., LEE, R. K. C. Stomach cancer among Japanese in Hawaii. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.49, p. 969-88, 1972.
- HAN, D. W. MA, X. H., ZHAO, Y. C. E YIN, L. The protective effects os oleanolic acid on experimental cirrhosis. **Journal of Traditional Chinese Medicine**. v. 3, p. 217- 223, 1981.
- HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- HARRIS, C. C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Res.**, suppl.51, p.5023s-44s, 1991.
- HE, L., MO, H., HADISUSILO, S., QURESHI, A. A., ELSON C. E. Isoprenoids supress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. **J. Nutr.** v. 127, p. 668-74, 1997.
- HEINZE, T., JONAS, S., KARSTEN, A., NEUHAUS, P. Determination of the oncogenes p53 and C-erb B2 in the tumour cytosols of advanced hepatocellular carcinoma (HCC) and correlation to survival time. **Anticancer Res.** v. 19(4A), p. 2501-3, 1999.
- HEMMINKI, K. DNA adducts, mutations and cancer. **Carcinogenesis**. v. 14 (10), p. 2007-12, 1993.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.
- HIGGINS, K. A., PEREZ, J. R., COLEMAN, A. J., DORSHKIND, K., MCCOMAS, W. A., SARMIENTO, U. M., ROSEN, C. A., AND NARAYANAN, T. A. Antisense inhibition of the p65 subunit of NF- κ B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 90, p. 9901-05, 1993.
- HOLLOSZY, F., IDEI, M., CSORBA, G., SZABO, E., BOKONYI, G., SEPRODI, A., MESZAROS, G., SZENDE, B., KERI, G. activation of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivative-induced apoptosis. **Anticancer Res.** v. 21(5), p 3485-91, 2001.
- HONG, W. K., SPORN, M. B. Recent advances in chemoprevention of cancer. **Science**, v. 278, p. 1073-7, 1997.

- HSU, S.-M., RAINE, L., FANGER, F. A. A comparative estudy of the proxidase-antiperoxidase method and na avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 75, p. 734-8, 1981.
- HUANG, J., SUN, Y., LU, S. Experimental study on apoptosis induced by ursolic acid isolated from asparagus in HL-60 cells. **Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.** v. 19(5), p. 296-8, 1999.
- HUANG, M. T., HO, C. T., WANG, Z. Y., FERRARO, T., LOU, Y. R., STAUBER, K., MA, W., GEORGIADIS, C., LASKIN, J. D. E CONNEY, A. H. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. **Cancer research.** v. 54, p. 701-708, 1994.
- HUFF, J. Issues and controversies surrounding qualitative strategies for identifying and forecasting cancer causing agents in the human environment. **Pharmacol. Toxicol.** v. 72, p. S12-27, 1993.
- HUMAN MED. INST. Effects of oleanolic acid on experimental liver injutry and therapeutic value in human hepatitis. **Traditional Medicine (Zhong Chao Yao).** v. 8, p. 32-37, 1977.
- IIDA, M., IWAT, H., INOUE, H., ENOMOTO, M., HORIE, N., TAKEISHI, K. Correlation between Bcl-2 overexpression and H-ras mutation in naturally occurring hepatocellular proliferative lesions of the B6C3F1 mouse. **Toxicological Sciences.** v. 56, p. 297-302, 2000.
- IMAI, T., MASUI, T., ICHINOSE, M., NAKANISHI, H., YANAI, T., MASEGI, T., MURAMATSU, M., TATEMATSU, M. Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by in situ hybridization. **Carcinogenesis.** v. 18, p. 545-51, 1997.
- INCA - MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, estimativas da incidência e mortalidade por câncer. INCA, Rio de Janeiro, 2005, 92p.
- ISHIDA, M., OKUBO, T., KOSHIMIZU, K., DAITO, H., TOKUDA, H., KIN, T., YAMAMOTO, T. AND YAMAZAKI, N. Topical preparations containing ursolic acid and/or oleanolic acid for prevention of skin cancer. **Chemical Abstract**, 113, 12173y. 1990.
- ITO, Y., YANASE, S., TOKUDA, H., KISHISHITA, M., OHIGASHI, H., IROTA, M., AND KOSHIMIZU, K. Epstein-Barr virus activation by tung oil, extracts of *Aleurites fordii* and its diterpene ester 12-O-hexadecanoyl-16- hydroxyphorbol-13-acetate. **Cancer Letters.** v. 18, p. 87-95. 1983.
- JIA, G., TOHYAMA, C., SONE, H. DNA damage triggers imbalance of proliferation and apoptosis during development of preneoplastic foci in the liver of Long-Evans Cinnamon rats. **Int. J. Oncol.** v. 21, p. 755-761, 2002.

- KAGAWA, Y. Impact of westernization on the nutrition of Japanese: changes in physique, cancer, longevity and centenarians. **Prev. Med.** v. 7, p. 205-17, 1978.
- KANDUTSCH, A. A., CHEN, H. W. Consequences of blocked sterol synthesis in cultured cells. **J. Biol. Chem.** v. 252, p. 409-15, 1977.
- KANUNFRE, C. C. , FREITAS, J. J. S., POMPEIA, C., ALMEIDA, D. C. G., CURY-BOAVENTURA, M. F. , VERLENGIA, R., CURI, R. Ciglitizone and 15d PGJ2 induce apoptosis in Jurkat and Raji cells. **Int Immunopharmacol.** v. 4(9), p. 1171-85, 2004.
- KARIM, R., IWAI, S., MORIMURA, K., WANIBUCHI, H., TANAKA, R., MATSUNAGA, S., YOSHITAKE, A., FUKUSHIMA, S. – Lack of modification of rat hepatocarcinogenesis by fernane-type triterpenoids, isolated from a Euphorbia genus. **Terat. Carcinog. Mutagen.** v. 22, p. 293-299, 2002.
- KASTAN, M. B., ONYEKWERE, O, SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., CRAIG, R. W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Res.** v.51, p. 6304-11, 1991.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer.** v. 26(4), p. 239-57, 1972.
- KEW, M. C., YU, M. C., KEDDA, M. A., COPPIN, A., SARKIN, A., HODKINSON, J. The relative roles of hepatitis B and C viruses in the etiology of hepatocellular carcinoma in southern African blacks. **Gastroenterology.** v. 112, p. 184-7, 1997.
- KIM, D. K., BAEK, J. H., KANG, C. M. YOO, M. A., SUNG, J. W., CHUNG, H. Y., KIM, N. D., CHOI, Y. H., LEE, S. H., KIM, K. W. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. **Int J Cancer.** v. 87(5), p 629-36, 2000.
- KIM, K. A., LEE, J. S., PARK, H. J., KIM, J. W., KIM, C. J., SHIM, I. S., KIM, N. J., HAN, S. M., LIM, S. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. **Life Sci.** v. 74(22), p. 2769-79, 2004.
- KIM, K. H., CHANG, M. W., KIM, E. Y., PARK, K. Y. AND SUNWOO, Y. I. Effects os oleanolic acid and ursolic acid on T subsets in sarcoma 180-transplanted mice. **Chemical Abstracts**, 119, 262145x. 1993.
- KITAGAWA, T. Histochemical analysis of hyperplastic lesions and hepatomas of the liver of rats fed N-2-fluorenylacetamide. **Gann**, v. 62, p. 207-216, 1971.
- KITAGAWA, T., PITOT, H. C. The regulation of serine dehydratase and glucose-6-phosphatase in hyperplastic nodules of rat liver during diethylnitrosamine and N-2-fluorenylacetamide feeding. **Cancer Res.** v. 35, p. 1075-1084, 1975.
- KITAJIMA, I., SHINOHARA, T., BILAKOVICS, J., BROWN, D. A., XU, X., NERENBERG, M. Ablation of Transplanted HTLV-I Tax-Transformed Tumors in Mice by Antisense Inhibition of NF- κ B. **Science.** v. 258, p. 1792-5, 1992.

- KIZZILIAN, N., WILKINS, R. C., REINHARDT, P., FERRAROTTO, C., MCLEAN, J. R. N., et al. Silver-stained comet assay for detection of apoptosis. **Biotechniques**, v. 27, p. 926-930, 1999.
- KLAUNIG, J. E., KAMENDULIS, L. M., XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 19, p. 543-555, 2000.
- KONG, J., RINGER, D. P. Quantitative analysis of changes in cell proliferation and apoptosis during preneoplastic and neoplastic stages of hepatocarcinogenesis in rat. **Cancer Letters**, v. 105, p. 241-248, 1996.
- KONG, T. A., YU, R., HEBBAR, V., CHEN, C., OWUOR, E., HU, R., EE, R., MANDLEKAR, S. Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. **Mutat. Res.** v. 480-481, p. 231-241, 2001.
- KOOLMAN, J., ROHM, K. – Isoprenoids. In: Color Atlas of Biochemistry , Koolman, J., Rohm, K., Thieme, Stuttgart, p. 50-1, 1996.
- LACONI, E., PANI, P., FARBER, E. The resistance phenotype in the development and treatment of cancer. **Lancet Oncol.**, v.1, p. 235-241, 2000.
- LAUTHIER, F., TAILLET, L., TROUILLAS, P., DELAGE, C., SIMON, A. Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human Daudi cells. **Anticancer Drugs**, v. 11(9), p. 737-45, 2000.
- LE BAIL, O., SCHMIDT-ULLRICH, R., ISRAEL, A. Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family. **EMBO J.** v. 12(13), p. 5043-9, 1993.
- LEDA-COLUMBANO, G. M., COLUMBANO, A., DESSÍ, S., CONI, P., CHIODINO, C., PANI, P. Enhancement of cholesterol synthesis and pentose phosphate pathway activity in proliferating hepatocyte nodules. **Carcinogenesis**, v. 6, p. 1371-73, 1985.
- LEDA-COLUMBANO, G. M., CONI, P., CURTO, M., GIACOMINI, L., FAA, G., SARMA, D. S. R., COLUMBANO, A. Mitogen-induced liver hiperplasia does not substitute for compensatory regeneration during promotion of chemical hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 13, p. 379-83, 1992.
- LEE, G. H. Correlation between Bcl-2 expression and histopathology in diethylnitrosamine-induced mouse hepatocellular tumors. **J. Pathol.** v. 151(4), p. 957-61, 1997.
- LEE, H. Y., CHUNG, H. Y., KIM, K. H., LEE, J. J. AND KIM, K.W. Induction of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells. **Japan Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, p. 513-518. 1994.
- LEE, H. Y., LIN, Y. M., WU, T-S, ZHANG, D-C, YAMAGISHI, T., HAYASHI, T., HALL, L. H., CHANG, J. J., WU, R. Y., YANG, T-S. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens* and *Hyptis capitata*: Ursolic acid and related derivatives. **Planta Medica**, v. 54, p. 308-311. 1988.

- LEVIN, J. Estatística Aplicada a Ciências Humanas, 2ª ed., Harbra, Harper e Row do Brasil, São Paulo, 392p, 1985.
- LIN, C. N., CHUNG, M. I. E GAN, K. H. Novel anti-hepatotoxic principles of *Solanum incanum*. **Planta Medica**, v. 54, p. 222, 1988.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J Ethnopharmacol.** v. 49(2), p. 57-68, 1995.
- LIU, J., LIU, Y. P., KLAASSEN, C. D. The effect of oleanolic acid on chemical-induced liver injury in mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 15, p. 16-23. 1995.
- LIU, J., LIU, Y. P., MADHU, C E KLAASSEN, C. D. Protective effects os oleanolic acid on acetaminophen hepatotoxicity in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 266, p. 1607-1613. 1993.
- LIU, PING., KIMMOUN, E., LEGRAND, A., SAUVANET, A., DEGOTT, C., LARDEUX, B., BERNUAU, D. Activation of NF-kappaB, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas. **Journal of Hepatology**, v. 37, p. 63-71, 2002.
- LIU, Y. G. Pharmaceutical composition for treating non-lymphatic leukemia and its components. **Chemical Pharmaceutical Journal**, v. 29, p. 725-726, 1986.
- LOEB, L. A., LOEB, K. R., ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 100, p. 776-781, 2003.
- LUQUE I, GELINAS C. Rel/NF-kappa B and I kappa B factors in oncogenesis. **Semin Cancer Biol.**, v. 8(2), p. 103-11. 1997.
- MA, X. H., ZHAO, Y. C., YIN, L., HAN, D. W. E JI, C. X. Studies on the effect of oleanolic acid on experimental liver injury. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 17, p. 93-97, 1982.
- MA, X. H., ZHAO, Y. C., YIN, L., HAN, D. W. E WANG, M. S. Studies on the preventive and therapeutics effects of ursolic acid on acute hepatic injury in rats. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 17, p. 93-97, 1986.
- MAGEE, P. N., FARBER, E. Toxic liver injury and carcinogenesis: methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. **Biochem. J.**, v. 83, p. 114-124, 1962.
- MAK, T. W., YEH, W-C. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. **Arthritis Res.**, v. 4, p. S243-S252, 2002.
- MARTINEZ, G. R., LOUREIRO, A. P. M., MARQUES, S. A., MIYAMOTO, S., YAMAGUCHI, L. F., ONUKI, J., ALMEIDA, E. A., GARCIA, C. C. M., BARBOSA, L. F., MEDEIROS, M. H. G., DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 115-127, 2003.
- MARTINEZ-BOTAS, J., FERRUELO, A. J., SUAREZ, Y., FERNANDEZ, C., GOMEZ-CORONADO, D., LASUNCION, M. A. Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle

- progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives. **Biochim Biophys Acta**, v. 29;1532(3), p.185-94, 2001.
- MAYER, R. J., ADAMS, J. L., BOSSARD, M. J., BERKHOUT, T. A. Effects of a novel lanosterol 14 alfa-demethylase inhibitor on the regulation of 3-hidroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in HepG2 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 20070-78, 1991.
- MO, H., ELSON, C. E. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids. **J. Nutr.**, v. 129, p. 804-13, 1999.
- MOLL, U.M., LAQUAGLIA, M., BÉNARD, J., RIOU, G. – Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 4407-4411, 1995.
- MONTESANO, R., HAINAUT, P., WILD, C. P. Hepatocellular carcinoma: from gene to public health. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 89, p. 1844-51, 1997.
- MORENO, F. S., RIZZI, M. B. S. L., DAGLI, M. L. Z., PENTEADO, M. V. C. Inhibitory effects of β -carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 10, p. 1817-22, 1991.
- MORENO, F. S., ROSSIELO, M. R., MANJESHWAR, S., NATH, R., RAO, P. M., RAJALAKSHMI S., SARMA, D. S. R. Effect of β -carotene on the expression of 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. **Cancer Lett.**, v. 96, p. 201-8, 1995.
- MORENO, F. S., S-WU, T., NAVES, M. M. V., SILVEIRA, E. R., OLORIS, S. C., DA COSTA, M. A. L., DAGLI, M. L. Z., ONG, T. P. The inhibitory effects of β -carotene and vitamin A during the progression phase of hepatocarcinogenesis involve inhibition of cell proliferation but not alterations in DNA methylation. **Nutr. Cancer**, v. 44, p. 80-88, 2002.
- MORENO, F. S., WU, T.-S., PENTEADO, M. V. C., RIZZI, M. B. S. L., JORDÃO Jr., A. A., ALMEIDA-MURADIAN, L. B., DAGLI, M. L. Z. A comparison of β -carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. **Internat. J. Vit. Nutr. Res.**, v. 65, p. 87-94, 1995.
- MORI, H., NIWA, K., ZHENG, Q., YAMADA, Y., SAKATA, K., YOSHIMI, N. Cell proliferation in cancer chemoprevention, effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis model and on an in vitro model in human colorectal cells. **Mutat. Res.**, v. 480-481, p. 201-207, 2001.
- MORI, H., SUGIE, S., YOSHIMI, N., HARA, A., TANAKA, T. Control of cell proliferation in cancer prevention. **Mutat. Res.**, v. 428, p. 291-298, 1999.
- MORSE, M. A., STONER, G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 1737-46, 1993.

- MUKHOPADHAYAY, T., ROTH, J. A., MAXWELL, S. A. Altered expression of the subunit of the NF- κ B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. **Oncogene**, v. 11, p. 999-1003, 1995.
- MUTO, Y., NINIMIYA, M. AND FUJIKI, H. Present status research on cancer chemoprevention in Japan. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 20, p. 219-224. 1990.
- NAGAO Y, FRENCH BA, CAI Y, FRENCH SW, WAN YJ. Inhibition of PPAR alpha/RXR alpha-mediated direct hyperplasia pathways during griseofulvin-induced hepatocarcinogenesis. **J Cell Biochem.**, v. ,69(2), p. 189-200. 1998.
- NAKAE, D., KOBAYASHI, Y., AKAI, H., ANDOH, N., SATOH, H., OHASHI, K., TSUTSUMI, M., KONISHI, Y. Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine. **Cancer Res.**, v. 57, p. 1281-1287, 1997.
- NAKANISHI, M., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S. Multivalent control of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Mevalonate-derived products inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme. **J. Biol. Chem.**, v.263, p.8929-37, 1988.
- NAKSHATRI, H., BHAT-NAKSHATRI, P., MARTIN DA, GOULET RJ JR, SLEDGE GW JR. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. **Mol Cell Biol.**, v. 17(7), p. 3629-39, 1997.
- NAKSHATRI, H., BHAT-NAKSHATRI, P., MARTIN, D. A., GOULET, R. J. JR., SLEDGE, G. W. JR. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. **Mol Cell Biol.** v. 17(7), p. 3629-39, 1997.
- NAVES, M.M.V. & MORENO, F.S. – Diferenciação das células ovas: importância na hepatocarcinogênese e papel modulador do Beta-caroteno. **Rev. Bras. Cancerologia**, v. 46 (4), p. 389-399, 2000.
- NAVES, M.M.V., SILVEIRA, E.R., DAGLI, M.L.Z., MORENO, F.S. – Effects of β -carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat. **J. Nutr. Biochem.**, v. 12 (12), p. 685-692, 2001.
- NEMETH, A., NADASI, E., GYONGYI, Z., OLASZ, L., NYARADY, Z., *et al.* Early effects of different cytostatic protocols for head and neck câncer on oncogene activation in animal experiments. **Anticancer Res.**, v. 23, p. 4831-4835, 2003.
- NEWTON, T. R., PATEL, N. M., BHAT-NAKSHATRI, P., STAUSS, C. R., GOULET, R. J., NAKSHATRI, H. Negative regulation of transactivation function but not DNA binding of NF-kappaB and AP-1 by IkappaBbeta1 in breast cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 274(26), p. 18827-35, 1999.

- NIIKAWA, M., HAYASHI, H., SATO, T., NAGASE, H. AND KITO, H. Isolation of substances from glossy privet (*Lingustrum lucidum* Ait) inhibiting the mutagenicity of benzo[a]pyrene in bacteria. **Mutation Research**, v. 319, p. 1-9, 1993.
- NIKOLAEV, A.Y., LI, M., PUSKAS, N., QIN, J., GU, W. Parc: a cytoplasmic anchor for p53. **Cell**, v. 112, p. 29-40, 2003.
- NURSE, P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. **Cell**, v. 79, p. 547-550, 1994.
- OGAWA, K., MEDLINE, A., FARBER, E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: the comparative architecture of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. **Br. J. Cancer**, v. 40, p. 782-790, 1979a.
- OGAWA, K., MEDLINE, A., FARBER, E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: a comparative study of the ultrastructure of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. **Lab. Invest.**, v. 41, p. 22-35, 1979b.
- OHASHI, K., TSUTSUMI, M., TSUJIUCHI, T., KOBITSU, K., OKAJIMA, E., NAKAJIMA, Y., NAKANO, H., TAKAHASHI, M., MORI, Y., KONISHI, Y. Enhancement of N-nitrosodiethylamine initiated hepatocarcinogenesis caused by a colchicine-induced cell cycle disturbance in partially hepatectomized rats. **Cancer Res.**, v. 56, p. 3474-3479, 1996.
- OHIGASHI, H., TAKAMURA, H., KOSHIMIZU, K., TOKUDA, H. AND ITO, Y. Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-O-hexadecanoyl-16- hydroxyphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation: ursolic acid and oleanolic acid from an anti-inflammatory Chinese medicinal plant, *Clechoma hederaceae* L. **Cancer Letters**, v. 30, p 143-151. 1986.
- OHIZUMI, H., MASUDA, Y., NAKAJO, S., SAKAI, I., OHSAWA, S., NAKAYA, K. Geranylgeraniol is a potent inducer of apoptosis in tumor cells. **J. Biochem.**, v. 117, p. 11-13, 1995.
- OHMURA, T., LEDDA-COLUMBANO, G. M., PIGA, R., COLUMBANO, A., GLEMB, J., KATYAL, S. L., LOCKER, J., SHINOZUKA, H. Hepatocyte proliferation induced by a single dose of a peroxisome proliferator. **Am J Pathol.**, v. 148(3), p. 815-24. 1996.
- OLIVE, P. L., BANÁTH, J. P., DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the 'comet' assay. **Radiation Res.**, v. 122, p. 8-94, 1990.
- OMS. Global strategy on diet, physical activity and health. **WHO**, 2004.
- ORTEGO, M., BUSTOS, C., HERNANDEZ-PRESA, M. A., TUNON, J., DIAZ, C., HERNANDEZ, G., EGIDO, J. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. **Atherosclerosis**. v. 147(2), p. 253-61. 1999.

- PARFENTEVA, E. P., VASILENKO, I. K., LISEVITSKAIA, L. I., OGANESIAN, E. T. Effect of ursolic acid on lipid metabolism indices in experimental atherosclerosis. **Vopr Med Khim.** v. 26(2), p. 174-9. 1980.
- PARKER, R. A., PEARCE, B. C., CLARK, R. W., GORDAN, D. A., WRIGHT, J. J. K. Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxi-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 11230-38, 1993.
- PASCALE, R. M., SIMILE, M. M., DE MIGLIO, M. R., FEO, F. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis: S-adenosyl-L-methionine. **Alcohol**, v. 27, p. 193-198, 2002.
- PEREZ, J. R., HIGGINS-SOCHASKI, K. A., MALTESE, J. Y., NARAYANAN, R. Regulation of adhesion and growth of fibrosarcoma cells by NF-kappa B RelA involves transforming growth factor beta. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14(8), p. 5326-32. 1994.
- PERRY, T. M. The new and old diseases: A study of mortality trends in the United States, 1900-1969. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.63, p.453-74, 1975.
- PEZZUTO, J. M. Plant derived anticancer agents. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, p. 121-33, 1997.
- PHILLIPS, R. L. Role of lifestyle and dietary habits in risk of cancer among Seventh Day Adventists. **Cancer. Res.**, v. 35, p. 3513-22, 1975.
- PHYTOCHEMICAL DATABASE, USDA - ARS - NGRL, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/duke/>> Acesso em: 20 de Junho de 2005.
- PINES, S. Cell cycle conformational change. **Nature**, v. 376, p. 294-295, 1995.
- PITOT, H. C. Pathway of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**, v. 358, p. 859-860, 2001.
- PITOT, H. C., DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v.5, p.2280-6, 1991.
- PITOT, H. C., DRAGAN, Y. P., TEEGUARDEN, J., HSIA, S., CAMPBELL, H. Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. **Toxicol. Pathol.**, v.24, p.119-28, 1996.
- PRICE, K. R., JOHNSON, I. T., FENWICK, G. R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 26(1), p 27-135. 1987.
- QUESNEY-HUNNEUS, V., WILEY, M. H., SIPERSTEIN, M. D. Essential role for mevalonate synthesis in DNA replication. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 5056-60, 1979.
- RAO, K. N. Regulatory aspects of cholesterol metabolism in cells with different degrees of replication. **Toxicol. Pathol.**, v. 14, p. 430-37, 1986.
- REED, J. C. Dysregulation of apoptosis in cancer. **Cancer J. Sci. Am.**, v. 1, p. S8-14, 1998.

- RHEW, T. H., PARK, S. M., PARK, K. Y., CHUNG, H. Y., HAR, J. C. AND LEE, C. K. Effects of ursolic acid on oncogene expression detected by *in situ* hybridization in mice. **Chemical Abstracts**, 119, 15174u. 1993.
- RIZZI, M. B. S. L., DAGLI, M. L. Z., JORDÃO JR, A. A., PENTEADO, M. DE V.C., MORENO, F.S. Effects of beta-carotene on GGT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. **Méd. Biol. Environ.**, v. 26(2), p. 215-219, 1998.
- RIZZI, M. B. S. L., DAGLI, M. L. Z., JORDÃO Jr., A. A., PENTEADO, M. V. C., MORENO, F. S. β -Carotene inhibits persistent and stimulates remodeling γ GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. **Internat. J. Vit. Nutr. Res.**, v. 67, p. 415-22, 1997.
- ROGERS, A. E., ZEISEL, S. H., GROOPMAN, J. Diet and carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 2205-17, 1993.
- ROOMI, M. W., KO, R. H., SARMA, D. S. R., FARBER, E. A common biochemical pattern in preneoplastic hepatocyte nodules generated in four different models in the rat. **Cancer Res.**, v. 45, p. 564-571, 1985.
- RUST, C., GORES, J. G. Apoptosis and liver disease. **Am. J. Med.**, v. 108, p. 567-574, 2000.
- RUSYN, I., BRADHAM, C. A., COHN, L., SCHOONHOVEN, R., SWENBERG, J. A., BRENNER, D. A., THURMAN, R. G. Corn oil rapidly activates nuclear factor-kappa B in hepatic Kupffer cells by oxidant-dependent mechanisms. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 2095-2100, 1999.
- SACCHETTINI, J. C., POULTER, C. D. Creating isoprenoid diversity. **Science**, v. 277, p. 1788-89, 1997.
- SAMBROOK, J e RUSSEL, D.W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- SARKAR, A., BISHAYEE, A., CHATTERJEE, M. Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepatocarcinogenesis. **Cancer Biochem. Biophys.**, v.15, p.111-125, 1995.
- SCHAFER, K. A . The cell cycle: a review. **Vet. Path.**, v. 35, p. 461-478, 1998.
- SCHEFFNER, M., WERNESS, B.A., HUITBREGTSE, J.M., LEVINE, A.J., HOWLEY, P.M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, p. 1129-1136, 1990.
- SCHULTE-HERMANN, R., BURSCH, W., GRASL-KRAUPP, B., MARIAN, B., TOROK, L., KAHL-RAINER, P., ELLINGER, A. Concepts of cell death and application to carcinogenesis. **Toxicol. Pathol.** v. 25, p. 89-93, 1997.

- SCHULTE-HERMANN, R., BURSCH, W., GRASL-KRAUPP, B., MULLAUER, L., RUTTKAY-NEDECKY, B. Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver. **Mutat Res.** v. 333(1-2), p. 81-7, 1995a.
- SCHULTE-HERMANN, R., BURSCH, W., GRASL-KRAUPP, B., TOROK, L., ELLINGER, A., MULLAUER, L. Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. **Toxicol Lett.** v. 82-83, p. 143-8, 1995b.
- SCHULTE-HERRMANN, R., TIMMERMAN-TROSIENER, I., BARTHEL, G., BURSCH, W. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. **Cancer Res.**, v. 50, p. 5127-5135, 1990.
- SCHWARZ, M., BUCHMANN, A., BOCK, K.-W. Role of cell proliferation at early stages of hepatocarcinogenesis. **Toxicol. Lett.**, v. 82/83, p. 27-32, 1995.
- SEMPLE-ROBERTS, E., HAYES, M. A., ARMSTRONG, D., BECKER, R. A., RACZ, W. J., FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **Int. J. Cancer**, v. 40, p. 643-5, 1987.
- SHARMA, S., STUTZMAN, J. D., KELLOFF, G. J., STEELE, V. E. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 5848-55, 1994.
- SHEN, H. M., ONG, C. N. Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis. **Mutat. Res.**, v. 366, p. 23-44, 1996.
- SHERR, C. J., McCORMICK, F., The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, p. 103-112, 2002.
- SHIBATA, S. Antitumor-promoting and anti-inflammatory activities of licorice principles and their modified compounds. **Chemical Abstracts**, 120, 124297t. 1994.
- SHIOTA, G., MAETA, Y., MUKOYAMA, T., YANAGIDANI, A., UDAGAWA, A., et al.: Effects of sho-saiko-to on hepatocarcinogenesis and 8-hidroxy-2'-deoxyguanosine formation. **Hepatology**, v. 35, p. 1125-1133, 2002.
- SHUKLA, Y. N., THAKUR, R. S., PACHALY, P. A bidesmosidic oleanolic acid saponin from *Panax pseudo-ginseng*. **Phytochemistry** v. 31(3), p. 1046-8, 1992.
- SILVEIRA, E.R. & MORENO, F.S. - Natural retinoids and β -carotene: from food to their actions on gene expression. **J. Nutr. Biochem.**, v. 9, p. 446-456, 1998.
- SILVEIRA, E.R., NAVES, M.M.V., VANNUCCHI, H., JORDÃO Jr., A.A., DAGLI, M.L.Z., MORENO, F.S. Vitamin A and all-trans and 9-cis retinoic acids inhibit cell proliferation during the progression phase of hepatocarcinogenesis in Wistar rats. **Nutr. Cancer**, v. 40(1), p. 244-251, 2001.

- SING, V. N., GABY, S. K. Premalignant lesions: role of antioxidant vitamins and β -carotene in risk reduction and prevention of malignant transformation. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 53, p. 386s-90s, 1991.
- SINGH, N.P., McCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. – A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 17, p. 184-191, 1988.
- SIPERSTEIN, M. D. Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. **J. Lipid. Res.**, v. 25, p. 1462-68, 1984.
- SIPERSTEIN, M. D., FAGAN, V. M. Deletion of the cholesterol negative feedback system in liver tumors. **Cancer Res.**, v. 24, p. 1108-1115, 1964.
- SMUCKLER, E. A. Chemicals, cancer and cancer biology. **West J. Med.**, v.139, p.55-74, 1983.
- SOLT, D. T., FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p. 702-3, 1976.
- SPARFEL, L., LOEWERT, M., HUC, L., PAYEN, L., GUILLOUZO, A., LAGADIC-GOSSMANN, D., FARDEL, O. Acute cytotoxicity of the chemical carcinogen 2-acetylaminofluorene in cultured rat liver epithelial cells. **Toxicol Lett.** v. 129(3), p. 245-54, 2002 .
- SPORN, M. B., DUNLOP, N. M., NEWTON, D. L., SMITH, J. M. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Fedn. Proc.**, v. 35, p. 1332-8, 1976.
- STANLEY, L. A. Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumour suppressor genes. **Toxicology**, v.104, p.173-94, 1995.
- STEELE, R.J.C., THOMPSON, A.M., HALL, P.A., LANE, D.P. – The *p53* tumor suppressor gene. **Brit. J. Surg.**, v. 85, p. 1460-1467, 1998.
- STERMER, B. A., BIANCHINI, G. M., KORTH, K.L. Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. **J. Lipid. Res.**, v. 35, p. 1133-40, 1994.
- STINCHCOMBE, S., BUCHMANN, A., BOCK, K.W., SCHWARZ, M. Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 1271–1275, 1995.
- STONER, G. D., MORSE, M. A., KELLOFF, G. J. Perspectives in cancer chemoprevention. **Environ. Health Perspect.**, v. 105, P. 945-54, 1997.
- STRYER, L. Biosynthesis of membrane lipids and steroid hormones. In: **Biochemistry**, L. Stryer, ed., W. H. Freeman and Co., NY, p.547-74, 1995.
- SU, Q., BANNASCH, P. relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. **Toxicol. Pathol.**, v. 31, p. 126-133, 2003.

- SU, Q., BENNER, A., HOFMANN, W. J., OTTO, G., PICHLMAYR, R., BANNASCH, P. Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. **Virchows Arch.**, v. 431, p. 391-406, 1997.
- SUH, N., HONDA, T., FINLAY, H. J., BARCHOWSKY, A., WILLIAMS, C., BENOIT, N. F., XIE, Q. W., NATHAN, C., GRIBBLE, G. W. AND SPORN, M. B. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxid synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. **Cancer Research**, v. 58(4), p 717-23. 1998.
- TATEMATSU, M., NAGAMINE, Y., FARBER, E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. **Cancer Res.**, v. 43, p. 5049-58, 1983.
- TOKUDA, H., OHIGASHI, H., KOSHIMIZU, K., YOHEI, I. – Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Lett.**, v. 33, p 279-285, 1986.
- TOLEDO, L. P., ONG, T. P., PINHO, A. L. G., JORDÃO Jr, A. A., VANUCCHI, H., MORENO, F. S. Inhibitory effects of lutein and lycopene on placental glutathione S-transferase positive preneoplastic lesions and DNA strand breakage induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis. **Nutr. Cancer**, v. 47, p. 62-69, 2003.
- TOMATIS, L. Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on na IARC workshop report. International Agency for Research on Cancer. **Environ. Health. Perspec.**, v.101. p. 149-51, 1993.
- UEDA, N., SHAH, S. Apoptosis. **J. Lab. Clin. Med.**, v.124, p.169-77, 1994.
- UEMURA, T., SAI-KATO, K., TAKAGI, A., HASEGAWA, R., KUOKAWA, Y. Oxidative DNA damage and cell proliferation in the livers of B6C3F1 mice exposed to pentachlorophenol in their diet. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 30, p. 285-289, 1996.
- UMEHARA, K., TAKAGI, R., KOROYANAGI, M., UENO, A., TAKI, T. AND CHEN, Y. J. Studies on differentiation-inducing activities of triterpenes. **Chemical and Pharmacological Bulletin**, v. 40, p 401-405. 1992.
- VAN GIJSEL, H.E., OHLSON, L.C.E., TORNDAL, U.-B., MULDER, G.J., ERIKSSON, L.C., PORSCHE-HÄLLSTRÖM, I., MEERMAN, J.H.N. – Loss of nuclear p53 protein in preneoplastic rat hepatocytes is accompanied by Mdm2 and Bcl-2 overexpression and by defective response to DNA damage in vivo. **Hepatology**, v. 32, p. 701-710, 2000.
- VENITT, S. Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer. **Clin. Chem.**, v.40, p. 1421-1425, 1994.

- VERHOEVEN, D. T., VERHAGEN, H., GOLDBOEHM, R. A., VAN DEN BRANDT, P. A., VAN POPPEL, G. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. **Chem. Biol. Interact.**, v. 103, p. 79-129, 1997.
- VISCONTI, R., CERUTTI, J., BATTISTA, S., FEDELE, M., TRAPASSO, F., ZEKI, K., MIANO, M. P., NIGRIS, F., CASALINO, L., CURCIO, F., SANTORO, M., FUSCO, A. Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NF κ B p65 expression. **Oncogene**, v. 15, p 1987-94, 1997.
- VOZIYAN, P. A., HAUG, J. S., MELNYKOVYCH, G. Mechanisms of farnesol cytotoxicity: Further evidence for the role of PKC-dependent signal transduction in farnesol – induced apoptotic cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 212, p. 479-86, 1995.
- WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, p. 351-360, 2002.
- WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1-8, 1985.
- WEBSTER, G. A., PERKINS, N. D. Transcriptional cross talk between K κ B and p53. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19(5), p 3485-3495, 1999.
- WEINSTEIN, I. B. The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. **Cancer Res.**, v. 48, p. 4135-43, 1988.
- WEISBURGER, J. H., RAINERI, R. Dietary factors and etiology of gastric cancer. **Cancer res.**, v. 35, p. 3469-74, 1975.
- WILLIAMS, G. M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. **Toxicology**, v. 166, p. 3-10, 2001.
- WILLIAMS, G. M. The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 605, p. 167-189, 1980.
- WOOD, G. A., KORKOLA, J. E., ARCHER, M. C. Tissue-specific resistance to cancer development in the rat: phenotypes of tumor-modifier genes. **Carcinogenesis**, v. 23 (1), p 1-9, 2002.
- WOOD, G. A., SARMA, D. S., ARCHER, M. C. Resistance to the promotion of glutathione S-transferase 7-7-positive liver lesions in Copenhagen rats. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1169-1175, 1999.
- WOODS, D. B., VOUSDEN, K. H. Regulation of p53 function. **Experimental Cell Research**, v. 264, p 56-66, 2001.
- WORLD CANCER RESEARCH FOUNDATION/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Patterns of cancer. In: Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective, p. 35-52, 1997.
- WYLLIE, A. H., KERR, J. F., CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol.** v. 68, p. 251-306, 1980.

- WYNDER, E., GORI, G. Contribution of the environment to cancer incidence> an epidemiological exercise. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 58, p. 825-32, 1977.
- YONISH-ROUACH, E., RESNITZKY, D., LOTEM, J., SACHS, L., KIMCHI, A., OREN, M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. **Nature**, v. 352, p. 345-347, 1991.
- YOSHIMI, N., WANG., A., MORISHITA, Y., TANAKA., T., SUGIE, S., KAWAI, K., YAMAHA, J. AND MORI, H. Modifying effects of fungal and herb metabolites on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. **Japanese Journal of Cancer Pharmacology Bulletin**. v. 17, p. 990-992,1992.
- YOU, H. J., CHOI, C. Y., KIM, J. Y., PARK, S. J., HAHM, K. S., JEONG, H. G. Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production via nuclear factor-kappaB activation in the resting macrophages. **FEBS Lett.** v. 7, p. 156-60. 2001.
- YOUNG, M. R., YANG, H-S., COLBURN, N. H. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kB and Pdc4. **Trends in Molec. Med.**, v. 9., p. 36-41, 2003.
- ZHANG, L. Z., LI, X. F. Study on the mechanism of oleanolic acid against experimental liver injury in rats. **Traditional Medicine and Clinical Pharmacology**, v. 8, p 24-26,1992.
- ZHAO, M., ZHANG, N. X., ECONOMOU, M., BLAHA, I., LAISSUE, J. A., ZIMMERMANN, A. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in liver lesions: bcl-2 protein is expressed in hepatocellular carcinomas but not in liver cell dysplasia. **Histopathology**. v. 25(3), p 237-45, 1994.

SUMMARY

MAZZANTINI, R. P. Effects of the triterpenoids oleanolic acid and ursolic acid in rat F344 submitted to the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis. 2005. 163 f. Thesis (Doctoral) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2005.

It was evaluated the effects of the oleanóico acid (OA) and ursolic acid (UA), triterpenoids present in vegetable foods and spices, when administered to rat F344 during the initiation and selection/promotion stages of the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis RH. The rat received for 8 weeks, by gavage and dissolved in corn oil (CO): OA or UA (8 mg/100 g of body weight [b.w.]). The control groups just received CO (0,25 mL/100 g b.w.; CO group), or water (0,25 mL/100 g b.w.; group Water). Normal group did not receive any treatment type. The initiation agent was dietilnitrosamine (DEN, 20 mg/100 g b.w.). 2 weeks after gavage, it was applied 3 consecutive doses of 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) (2 mg/100 g of b.w.) and it was made a 70% partial hepatectomy, added of 1 dose of 2-AAF (0,5 mg/100 g b.w.) 4 days after the surgery. In 6 weeks after the initiation, the animals were sacrificed. Results: the macroscopic analysis demonstrated that OA did not alter and UA tended to increase the number of hepatocytes nodules, compared to the CO group. The morphometric analysis of the pre-neoplastic lesions (PNL) positive for glutathione S-transferase placentary form (GST-p), demonstrated that OA and UA did not alter the medium number of persistent LPN, however they reduced the medium number of remodeling LPN, compared to the OM group ($p < 0,05$). OA and UA did not alter the medium area of persistent LPN, but they reduced the medium area of remodeling LPN, compared to the CO group ($p < 0,05$). The triterpenoids did not alter the occupied area of the section for persistent LPN, but they reduced the occupied area cut for remodeling LPN, compared to the CO group ($p < 0,05$). The Water, OM and AU groups showed increase in the plasmatic concentration of cholesterol, compared to the Normal group. OA promoted increase of the expression of the gene that codifies for the

HMG-CoA reductase enzyme, compared to the Normal group ($p < 0,05$), and AU promoted increase expression when compared to the Normal, Water, OM and AU groups ($p < 0,05$). OA and UA did not alter the indexes of cellular proliferation (immunohistochemistry for bromodeoxyuridine [BrdU]) in persistent LPN. AU promoted increase ($p < 0,05$) in the cellular proliferation in remodeling LPN when compared to the CO group. OA and UA did not alter the apoptosis in persistent LPN, but they increased the medium number of apoptotic bodies in remodeling LPN ($p < 0,05$). The Adjusted Index Growth (cellular apoptosis/proliferation) of the groups demonstrated that, in persistent LPN, the cellular proliferation has predominance on the apoptosis. In remodeling LPN, the apoptosis has preponderance over the cellular proliferation. The damages in hepatic DNA (method of the "comet") were larger in the group OA ($p < 0,05$) and AU ($p < 0,061$), compared to the CO group. The analysis for immunoblot revealed that the RH model increased the expression and the activation of the NF- κ B transcription factor ($p < 0,05$). OA and UA increased the expression and the activation of NF- κ B, compared to the CO group ($p > 0,05$). It was observed that the p53 tumor suppressor protein is accumulated in the hepatocytes cytoplasm of 77,2% (Water), 66,5% (CO), 69,6% (OA) and 69,7% (UA) of persistent LPN, and of 22,8% (Water), 33,5% (CO), 30,4% (OA) and 30,3% (UA) of remodeling LPN marked for p53. The bcl-2 anti-apoptotic protein presented increase expression in 78,4% (Water), 72,6% (CO), 73,0% (OA) and 70,4% (UA) of persistent LPN, and of 21,6% (Water), 27,4% (CO), 27,0% (OA) and 29,6% (UA) of remodeling LPN marked for bcl-2. Conclusions: AO and AU did not present chemopreventive activity in the study conditions, but they reduced remodeling PNL. The apoptosis increase and cellular proliferation decrease are involved with the remodeling. The transcription factor NF- κ B is involved with the hepatocarcinogenesis. AO and AU increased the expression and the activation of NF- κ B. The p53 accumulation in the cytoplasm, as well as the increased expression of bcl-2 is related to the phenotype of persistent PNL.

Key words: Chemoprevention, NF- κ B, p53, bcl-2, DNA damage, HMG-CoA reductase.