

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

Atividade quimiopreventiva do geraniol e  $\beta$ -ionona quando  
administrados isoladamente ou em associação a ratos durante  
a fase de promoção da hepatocarcinogênese

Mônica Testoni Cardozo

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Prof. Fernando Salvador Moreno

São Paulo  
2007

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

Atividade quimiopreventiva do geraniol e  $\beta$ -ionona quando administrados isoladamente ou em associação a ratos durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese

Mônica Testoni Cardozo

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:  
Prof. Fernando Salvador Moreno

São Paulo  
2007

**Ficha Catalográfica**

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

Cardozo, Mônica Testoni

C268a Atividade quimiopreventiva do geraniol e  $\beta$ -ionona quando administrados isoladamente ou em associação a ratos durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese / Mônica Testoni Cardozo. -- São Paulo, 2007.  
123p.

Dissertação (mestrado) - 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. Câncer : Prevenção 3. Alimento natural : Ciência dos alimentos I. T. II. Moreno, Fernando Salvador, orientador.

641.1 CCD

Atividade quimiopreventiva do geraniol e  $\beta$ -ionona quando administrados isoladamente ou em associação a ratos durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

---

orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de 2007.

*Dedicatória*

*Aos meus pais, Doraci e Paulo, por todo*

*apoio, incentivo e carinho.*

*A vocês devo tudo que sou hoje.*

## *Agradecimentos*

*Muitos foram aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho. É impossível citar todos, ainda que verdadeiro o meu reconhecimento. Entretanto, não posso deixar de citar aqueles que foram fundamentais desde o início dessa trajetória.*

*Ao professor Fernando Salvador Moreno, agradeço profundamente por toda paciência e pela iluminação irreversível de tantos ensinamentos. Sua imensa sabedoria e dom profissional refletem alegremente os versos do poeta Rubem Alves: “A tarefa do professor: mostrar a frutinha. Comê-la diante dos olhos dos alunos, provocar a fome, erotizar os olhos. Fazê-los babar de desejos. Acordar a inteligência adormecida. Ai a cabeça fica grávida: engorda com idéias. E, quando a cabeça engravida, não há quem segure o corpo”. Você nos ensina com tanto amor que nos faz apaixonarmos mais e mais pela ciência. Muito obrigado por toda sua dedicação!*

*Ao professor Dr. Thomas Prates Ong, que exerceu um papel de co-orientador, muito obrigada por todo o incentivo, apoio e ensinamentos. Presente sempre nos momentos mais difíceis e alegres da ciência, você é o exemplo do sucesso quando fazemos o que amamos.*

*Aos meus pais, Doraci e Paulo, muito obrigado pelo apoio, incentivo e por todo carinho. Mesmo à distância, o carinho de vocês foi essencial durante toda esta trajetória.*

*Às professoras Maria Lúcia Zadain Dagli da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP e Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira da Faculdade de Medicina – USP, agradeço pelas contribuições na minha banca de qualificação.*

*À amiga Aline de Conti, meu anjo da guarda paulista, um agradecimento especial por toda a amizade desde o início dessa trajetória. Tua alegria, inteligência e amor pela pesquisa motiva a todos que trabalham com você.*

*Ao círculo de amigos que estiveram presentes durante todos os momentos, colaborando com este trabalho nas formas mais diversificadas: Alessandra, Bruna, Carlos, Clarissa, Camila, Douglas, Julianna, Joice, Renato e Wesley. Obrigado a todos vocês pelas contribuições e pela amizade, dentro e fora do laboratório.*

*Agradeço também a todos que me deram as condições básicas para que este trabalho pudesse ser realizado: bioteristas e funcionários do departamento: Edilson, Mônica, Cléo, Lurdinha e Joana.*

*Às agências de fomento: Capes, pela concessão da minha bolsa, CNPQ e FAPESP pelo auxílio financeiro ao laboratório.*

*“Siga a sua alegria, e o universo abrirá  
portas para você onde antes só havia  
paredes”*

*Joseph Campbell*



## RESUMO

CARDOZO, M. T. **Atividade quimiopreventiva do geraniol e  $\beta$ -ionona quando administrados isoladamente ou em associação a ratos durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese.** 2007. 123 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Foram avaliados as atividades quimiopreventivas da  $\beta$ -ionona (BI) e do geraniol (GR) durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese. Ratos Wistar foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” e receberam durante 5 semanas consecutivas: 16 mg/100 g p.c. de BI, 25 mg/100 g p.c. de GR, 16 mg/100 g p.c. de BI + 25 mg/100 g p.c. de GR ou somente 25 ml/100 g p.c. de óleo de milho (grupo OM, controle). Em comparação ao grupo OM, o grupo BI apresentou menor multiplicidade de nódulos hepáticos e os grupos BI, GR e GR+BI apresentaram menor número de lesões pré-neoplásicas (LPN) persistentes e maior porcentagem de LPN em remodelação. Comparados ao grupo OM, o grupo BI apresentou menor área de LPN em remodelação e menor porcentagem da área do corte histológico ocupado por LPN persistentes enquanto o grupo GR apresentou menor porcentagem da área do corte histológico ocupado por LPN em remodelação. O tratamento com BI tendeu a reduzir o colesterol plasmático e inibir a proliferação celular em LPN. O grupo GR apresentou maior número de corpúsculos apoptóticos em LPN persistentes em comparação ao grupo OM. Comparados ao grupo OM, os grupos BI e GR+BI apresentaram menor porcentagem de LPN hepáticas em remodelação positivas para a proteína p53 citoplasmática. Já o grupo GR apresentou maior porcentagem de LPN hepáticas persistentes positivas para p53. Os níveis da proteína RhoA nas membranas celulares hepáticas foram menores no grupo GR quando comparados aos do grupo OM. Assim, BI e GR são quimiopreventivos supressores promissores da hepatocarcinogênese.

Palavras-chave: Quimioprevenção. Hepatocarcinogênese. Geraniol.  $\beta$ -ionona.

## ABSTRACT

CARDOZO, M. T. **Chemopreventive activity of geraniol and  $\beta$ -ionone when administrated alone or in combination during the promotion phase of hepatocarcinogenesis in rats.** 2007. 123 f. Master's degree dissertation – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2007.

Chemopreventive activities of  $\beta$ -ionone (BI) and geraniol (GR) were evaluated during promotion phase of hepatocarcinogenesis. Wistar rats received GR (25 mg/100 g body weight), BI (16 mg/100 g body weight), GR (25 mg/100 g body weight) +BI (16 mg/100 g body weight) or corn oil (CO, control). Multiplicity of hepatic nodules were smaller in BI group, compared to CO group. BI, GR and GR+BI groups presented decreased number of persistent preneoplastic lesions (PNL) and increased % of remodeling PNL. BI group presented decreased % liver section area occupied by persistent and remodeling PNL. GR group presented decreased % liver section area occupied by remodeling PNL. BI group tended to present reduced cholesterol concentration and inhibited cell proliferation. GR group increased number of apoptotic bodies in persistent PNL. BI and GR+BI groups reduced the % of remodeling and increased the % of persistent p53 positive PNL. RhoA protein in cellular membranes was reduced in GR group. Thus, BI and GR could be considered as chemopreventive agents against hepatocarcinogenesis.

Key-words: Chemoprevention. Hepatocarcinogenesis. Geraniol.  $\beta$ -ionone.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Via resumida do mevalonato.....   | 27 |
| <b>Figura 2.</b> Via da síntese de isoprenóides.....   | 28 |
| <b>Figura 3.</b> Estrutura química do isoprenóide acíclico geraniol.....   | 30 |
| <b>Figura 4.</b> Estrutura química do isoprenóide cíclico $\beta$ -ionona.....   | 31 |
| <b>Figura 5.</b> Mecanismos propostos de atividade quimiopreventiva dos moduladores da HMG-CoA redutase.....   | 33 |
| <b>Figura 6.</b> Representação esquemática do protocolo experimental.....  | 46 |
| <b>Figura 7.</b> Evolução ponderal de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.....                                    | 56 |
| <b>Figura 8.</b> Consumo alimentar de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.....                                    | 58 |
| <b>Figura 9.</b> Digitalização de fotografias do fígado de ratos Wistar tratados com óleo de milho (A) ou $\beta$ -ionona (B) durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”..... | 61 |
| <b>Figura 10.</b> (A) Marcação imunoistoquímica de LPN GST-P positivas em remodelação (objetiva de 20X) e (B) persistente (objetiva de 10X), de fígado de rato submetido ao modelo do “Hepatócito Resistente”.....         | 65 |
| <b>Figura 11.</b> Corte histológico hepático de rato Wistar marcado imunoistoquimicamente para BrdU e GST-P. As setas indicam a presença de células marcadas positivamente para BrdU dentro de uma LPN. Objetiva: 40X..... | 67 |
| <b>Figura 12.</b> Cortes histológicos hepáticos de rato Wistar corado com hematoxilina e eosina (A) e submetidos à fluorescência (B), indicando a presença de um corpúsculo apoptótico. Objetiva: 40X.....                 | 73 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 13.</b> Fotomicrografias de corte histológico de fígado submetido ao modelo do RH. A. LPN marcada positivamente para p53. Objetiva de 20X. B. A seta indica imunomarcacão citoplasmática de p53 em hepatócitos de uma LPN persistente. Objetiva de 40X. C. Controle positivo para marcação imunoistoquímica para p53. Carcinoma de células escamosas (DakoCytomation, Carpinteria), no qual se observa marcação nuclear para a proteína p53. Objetiva de 40X..... | 75 |
| <b>Figura 14.</b> Quimioluminescência obtida por meio da técnica “western blot”, capturada em filme de Raio-X, mostrando a banda correspondente à proteína RhoA presente na membrana celular de tecido hepático.....  | 78 |
| <b>Figura 15.</b> Normalização dos valores obtidos por meio do “western blotting” da proteína RhoA. Os valores (média ± desvio padrão) estão expressos em unidades densitométricas arbitrárias dos grupos submetidos ao modelo do “RH” em relação ao grupo NT, considerado como 1.....  | 79 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Pesos corpóreo inicial e final, peso absoluto e relativo dos fígados de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”  | 54 |
| <b>Tabela 2.</b> Incidência e multiplicidade de nódulos visíveis à macroscopia dos fígados de ratos Wistar tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”   | 59 |
| <b>Tabela 3.</b> Análise morfométrica de LPN hepáticas persistentes e em remodelação de ratos Wistar tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”   | 63 |
| <b>Tabela 4.</b> Marcação de células BrdU positivas nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN e em LPN persistentes e em remodelação de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”      | 68 |
| <b>Tabela 5.</b> Concentração plasmática de colesterol total de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”   | 70 |
| <b>Tabela 6.</b> Quantificação de corpúsculos apoptóticos em LPN persistentes, em remodelação e nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” | 71 |
| <b>Tabela 7.</b> Porcentagem de LPN hepáticas persistentes ou em remodelação com marcação imunoistoquímica citoplasmática para p53 de ratos Wistar tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”                           | 76 |

## LISTA DE ABREVIÇÕES

2-AAF – 2-acetilaminofluoreno

BI –  $\beta$ -ionona

BRDU – 5-bromo-2-desoxiuridina

CA – Corpúsculo apoptótico

CBA – Composto bioativo de alimentos

DEN – Dietilnitrosamina

E – Eutanásia

GR – Geraniol

GR+BI – geraniol+ $\beta$ -ionona

GST-P – Glutathione S-transferase forma placentária

HBV – Vírus da hepatite B

HCC – Carcinoma hepatocelular

HCV – Vírus da hepatite C

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA

HP – Hepatectomia parcial

H&E – hematoxilina de Harris e eosina

LPN – Lesões pré-neoplásicas

NT – Não tratados

OMS – Organização mundial da saúde

RH – Hepatócito resistente

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>I INTRODUÇÃO</b> .....  | 16 |
| <b>II OBJETIVOS</b> .....  | 37 |
| 2.1 Geral.....   | 37 |
| 2.2 Específicos.....   | 38 |
| <b>III MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 39 |
| 3.1 Animais.....   | 39 |
| 3.2 Modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” .....           | 40 |
| 3.3 Protocolo Experimental.....  | 40 |
| 3.4 Aplicação da 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) e Eutanásia dos Animais..... | 42 |
| 3.5 Exame Macroscópico dos Fígados.....                                      | 43 |
| 3.6 Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas.....               | 44 |
| 3.6.1 Marcação Imunoistoquímica para GST-P.....                              | 45 |
| 3.6.2 Procedimento para Quantificação de LPN GST-P Positivas.....            | 46 |
| 3.7 Quantificação da Proliferação Celular.....                               | 47 |
| 3.8 Quantificação da Apoptose.....   | 48 |
| 3.9 Determinação das Concentrações de Colesterol Plasmático Total.....       | 50 |
| 3.10 Análise da proteína p53.....  | 50 |
| 3.11 Análise da proteína RhoA.....   | 51 |
| 3.11.1 Preparação dos Extratos protéicos.....                                | 51 |
| 3.11.2 Western Blot.....   | 52 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.12 Análise Estatística.....  | 53        |
| <b>IV RESULTADOS.....</b>  | <b>54</b> |
| 4.1 Pesos corpóreos inicial e final, bem como pesos dos fígados de ratos tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” .....  | 54        |
| 4.2 Análise macroscópica dos fígados de ratos tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” .....   | 59        |
| 4.3 Análise morfológica de LPN hepáticas marcadas positivamente para a enzima GST-P de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” .....  | 62        |
| 4.4 Quantificação da proliferação celular hepática de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” .....   | 66        |
| 4.5 Concentração plasmática de colesterol total de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” .....  | 69        |
| 4.6 Quantificação de corpúsculos apoptóticos presentes dentro e fora das lesões marcadas positivamente para a enzima GST-P nos fígados de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” ..... | 71        |
| 4.7 Quantificação de LPN marcadas positivamente para a proteína p53 nos cortes histológicos dos fígados de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” .....                                | 74        |
| 4.8 Avaliação da proteína RhoA na membrana celular hepática de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” .....  | 77        |



|  |            |
|--|------------|
| <b>V DISCUSSÃO.....</b>                | <b>81</b>  |
| <b>VI CONCLUSÕES.....</b>              | <b>98</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | <b>99</b>  |
| <b>ANEXOS OBRIGATÓRIOS.....</b>        | <b>112</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 11 milhões de indivíduos são diagnosticados com câncer anualmente. Esse índice tende a aumentar com o passar dos anos, com estimativa de aumento de 50% até 2020 (OMS, 2006).

Considerando-se o grande número de casos novos de cânceres no Brasil (aproximadamente 470.000 casos em 2005) e as diferenças na incidência dessa doença no mundo, o desenvolvimento de estratégias quimiopreventivas utilizando-se compostos presentes em alimentos pode apresentar grande impacto tanto na ciência médica como na economia mundial (AGGARWALL; SHISHODIA, 2006; RIBEIRO et al., 2006).

Dentre os cânceres mais comuns, o carcinoma hepatocelular (HCC) é o 3º mais freqüente no mundo e a quinta causa mais comum de mortalidade por câncer (BENOWITZ, 2007). Aproximadamente 560.000 casos novos de câncer hepático são diagnosticados anualmente, contribuindo significativamente para os elevados índices de mortalidade por câncer no mundo (FERLAY et al., 2001). Além disso, estima-se que o número de pacientes com HCC dobre nas próximas duas décadas (MARRERO, PELLETIER, 2006).

As infecções pelos vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV) consistem na causa predominante do câncer primário de fígado. Outros fatores de risco incluem substâncias químicas como N-nitrosaminas, compostos N-nitrosos e radiação (CHEN et al., 1997; LIM, 2002; LLOVET; BURROUGHS; BRUIX, 2003). Estes compostos são conhecidos por gerarem modificações químicas nas bases do DNA,

como ligações covalentes dos carcinógenos ao DNA (formação de adutos), oxidação de bases ou erro no reparo do DNA. Todas estas alterações levam a mutações em genes específicos, alguns dos quais são críticos para o estabelecimento de neoplasias em animais e humanos (SHARMA, FARBER, 2004; LIM, 2002).

Existem mais de 100 tipos e subtipos distintos de neoplasias, que podem ser classificadas em benignas, as quais apresentam uma proliferação celular lenta, localizada e circunscrita, exercendo pressão nos tecidos adjacentes, mas que não ultrapassam suas divisas; ou neoplasias malignas ou cânceres, que possuem a capacidade de invadir e se multiplicar rapidamente em diferentes partes do organismo (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O desenvolvimento de neoplasias, ou seja, a carcinogênese, é 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, 1990). A carcinogênese pode ser induzida em organismos vivos por uma série de agentes físicos, como a radiação; biológicos, como macromoléculas com peso molecular relativamente elevado, como DNA ou RNA; ou químicos, como moléculas de menor peso molecular com ação no DNA celular (PITOT; DRAGAN, 1991).

O primeiro evento no processo da carcinogênese é o estágio da iniciação, envolvendo alterações permanentes e irreversíveis do material genético. O segundo estágio é a promoção, o qual envolve a expansão clonal seletiva das células iniciadas, pela ação de um agente promotor, formando assim lesões pré-neoplásicas (LPN) (PITOT, 2001). Este estágio é longo e reversível, sendo, portanto, um ponto estratégico para a ação de agentes quimiopreventivos.

A formação de LPN pode ocorrer por meio de mecanismos endógenos intrínsecos ou via agentes exógenos. Fatores endógenos atuando no estágio da promoção incluem hormônios e fatores do crescimento. Agentes exógenos incluem uma variedade de compostos químicos e físicos capazes de induzir a proliferação das células iniciadas (PITOT; DRAGAN, 1991; PITOT, 1996; KLAUNING, 2000; YOUNG et al., 2003).

A formação de neoplasias envolve a produção de clones de células com alterações bioquímicas e genéticas adicionais, relacionadas com uma taxa de proliferação aumentada e caráter invasivo, sendo, portanto, correspondente ao estágio da progressão da carcinogênese (PITOT; DRAGAN, 1991; KLAUNIG, 2000; YOUNG et al., 2003; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004; LIBBRECHT et al., 2005). Assim, o câncer pode ser considerado uma doença complexa que resulta de alterações simultâneas em genes geralmente relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular (PARMIGIANI; CAMARGO, 2004).

O padrão do desenvolvimento de neoplasias de fígado em ratos é semelhante ao que se observa em humanos (FARBER; SARMA, 1987; BANNASCH et al., 2003). Por isso, modelos de hepatocarcinogênese vêm sendo considerados dentre os melhores para o estudo de neoplasias *in vivo*.

Um modelo classicamente utilizado para o estudo da hepatocarcinogênese em ratos é o do Hepatócito Resistente (RH) descrito em 1976 (SOLT; FARBER, 1976) e modificado em 1987 (SEMPLE-ROBERTS et al., 1987). Este consiste na administração única de um agente iniciante, no caso a dietilnitrosamina (DEN), por via intraperitoneal. Após duas semanas, os animais recebem, via intragástrica, 4 doses de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), um potente agente mito-inibitório dos hepatócitos normais, e, 24 horas após a última dose, estes são submetidos a uma

hepatectomia parcial a 70%, responsável por intenso estímulo mitogênico. Dois e quatro dias após a cirurgia, administram-se doses adicionais de 2-AAF, também por intubação gástrica (SOLT; FARBER, 1976; SEMPLE-ROBERTS et al., 1987).

A DEN é um potente agente iniciante freqüentemente utilizado em estudos de carcinogênese experimental. Seu metabolismo envolve enzimas do sistema monooxigenase dependente do citocromo p450, como a enzima CYP2E1, gerando metabólitos responsáveis pelo início dos efeitos tóxicos, ocasionados pela formação de peróxido de hidrogênio e ânions superóxidos (CHIARELLO et al., 1998). Metabólitos ativos da DEN podem formar ligações covalentes com importantes constituintes celulares, resultando em mutações, necrose e neoplasias (YOO et al., 1988; TRAVIS; BELEFANT, 1992).

Devido à fraca atividade promotora da DEN, o 2-AAF é utilizado como um agente promotor da hepatocarcinogênese e é conhecido por promover o crescimento de hepatócitos enzimaticamente alterados, sem alterar a taxa de crescimento dos hepatócitos normais (TRAVIS; BELEFANT, 1992).

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

Além disso, o modelo do RH baseia-se no fato de que diversos carcinógenos químicos são capazes de produzir hepatócitos com um fenótipo novo (um fenótipo resistente), durante a etapa de iniciação do processo carcinogênico, os quais podem

rapidamente formar proliferações focais (focos e nódulos pré-neoplásicos) (FARBER; SARMA, 1987; PITOT et al., 1996).

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 isso ocorre de forma rápida e sincronizada, de modo que LPN já podem ser observados macroscopicamente em uma ou duas semanas após a etapa de seleção/promoção inicial (SOLT; FARBER, 1976; FARBER; SARMA, 1987).

Essas lesões podem ser identificadas por meio da expressão alterada de enzimas hepáticas, como uma menor indução de enzimas de fase I e uma maior indução de enzimas de fase II de biotransformação. Em ratos, as células iniciadas podem ser identificadas em estágios iniciais por meio de marcação imunoistoquímica para a enzima Glutathione S-transferase (GST) na forma placentária (GST-P) (FEO et al., 2005).

As GSTs são uma família de enzimas de fase II envolvidas na destoxificação de compostos químicos, por meio da conjugação de metabólitos de carcinógenos com glutathione (MORIMURA et al., 1993, NOWELL et al., 2004).

A GST-P é um membro dessa família e está presente em quantidade traço no fígado normal. No entanto, esta proteína encontra-se grandemente expressa em focos e nódulos pré-neoplásicos bem como em carcinomas hepatocelulares induzidos por carcinógenos como a DEN, aflotoxina B1, e 2-AAF. A GST-P não está presente no fígado fetal e não aumenta no fígado em processo regenerativo (MORIMURA et al., 1993; HIGASHI et al., 2004).

O aparecimento de LPN GST-P positivas e sua expansão clonal são requeridos para criar condições que favoreçam o subsequente estágio da carcinogênese, porém, somente um número limitado dessas LPN (cerca de 2-5%) adquire a capacidade de crescimento autônomo e progride para nódulos neoplásicos e HCC (TATEMATSU et al., 1983; FARBER; RUBIN, 1991; HIGASHI et al., 2004; FEO et al., 2005). Nódulos neoplásicos são facilmente observáveis ao redor de 7 meses após aplicação do agente iniciante DEN e demonstram sequência progressiva de evolução celular, com a ocorrência de “nódulos em nódulos” e, finalmente, aparecimento de neoplasia maligna após cerca de 10-11 meses (FARBER et al., 1988).

A maioria das LPN GST-P positivas (cerca de 95 a 98%) apresentam menor capacidade de crescimento e adquirem o fenótipo de reversão (remodelação), demonstrando, portanto, a incapacidade de crescimento autônomo e retornando ao aspecto “normal” do fígado (FEO et al., 2005).

Entretanto, uma pequena população de nódulos persistentes apresenta o mesmo padrão bioquímico observado na maioria dos nódulos que sofre remodelação (nódulos precoces) (FARBER; SARMA, 1987; FARBER, 1990), podendo ter o mesmo padrão de remodelação que a maioria dos nódulos, embora muito mais lento. Não existem evidências de que nódulos que remodelam e aqueles que persistem representem, na verdade, duas respostas inteiramente diferentes à ação de carcinogênicos (FARBER, 1990).

Especula-se que a remodelação possa envolver a rediferenciação dos hepatócitos dos nódulos para um fenótipo semelhante ao do tecido normal (TATEMATSU et al., 1983; FARBER et al., 1988; FEO et al., 2005), ou até mesmo a morte das células e remodelação dos nódulos (FEO et al., 2005). Além disso,

acredita-se que a persistência dos nódulos talvez indique um bloqueio na diferenciação celular ou na apoptose (FARBER et al., 1988; FARBER; RUBIN, 1991; DE MIGLIO et al., 2003), podendo estar relacionada com uma maior tendência de evolução para os carcinomas hepatocelulares (OHASHI et al., 1996; DE MIGLIO et al., 2003).

Dessa forma, a importância do fenômeno de remodelação evidencia-se pela prevenção da hepatocarcinogênese por compostos que induzem este processo, bem como pela sua implicação em alguns casos de regressão espontânea de nódulos e neoplasias hepáticas em humanos (FEO et al., 2005). O mecanismo da remodelação na hepatocarcinogênese não é bem conhecido; entretanto, considera-se a proliferação celular e a apoptose eventos críticos na progressão da neoplasia e na sua remodelação (KANUNFRE, 2004; FEO et al., 2005).

No animal adulto normal, os hepatócitos são altamente diferenciados e raramente entram em divisão celular, encontrando-se em estado de quiescência (na fase G0 do ciclo celular) (ALBRECHT; HANSEN, 1999; ZIMMERMAN, 2004). Nesse contexto, descreve-se que a proliferação celular aberrante é um dos principais marcadores neoplásicos (MALUMBRES; BARBACID, 2001; SANDAL, 2002), uma vez que acelera tanto a fixação de lesões primárias no DNA, como mutações e a perda da heterozigose para genes supressores de tumor (VERMEULEN; BOCKNTAELE; BERNEMAN, 2003).

Genes estimuladores da proliferação celular incluem os proto-oncogenes, enquanto os inibidores são 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). Modificações na expressão desses genes



geralmente são observadas na carcinogênese, conferindo à célula vantagens de crescimento e desenvolvimento em relação às células normais (WARD, 2002).

Juntamente com a proliferação, a morte celular programada, ou seja, a apoptose, garante a homeostasia tecidual e tem um importante papel em muitos processos biológicos incluindo a carcinogênese (KONG et al., 2001).

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

A apoptose pode ser induzida por meio da via de receptores de morte (via extrínseca) ou por meio da via mitocôndrial (via intrínseca) (DING; YI, 2004), mas sempre culminando na ativação de enzimas denominadas caspases. Estas são cisteíno-aspartato proteases presentes na forma inativa no citosol que, uma vez ativadas em cascata, são responsáveis pelas conseqüências morfológicas e bioquímicas da apoptose.

As células que morrem por este processo exibem tipicamente características morfológicas bem distintas (GERL, VAUX, 2005). Geralmente, células apoptóticas retraem e sua cromatina condensa ao redor da margem do núcleo. As membranas internas e externas se mantêm preservadas durante a apoptose, sem gerar resposta inflamatória (BURSCH et al., 1992). A maior parte dos corpúsculos apoptóticos (CA) é fagocitada pelos macrófagos ou células vizinhas e digerida pelos lisossomos celulares (SHULTE-HERMAM, 1997).

Durante a fase da iniciação da carcinogênese hepática observa-se uma rápida proliferação e um aumento de células em apoptose. Já na fase de promoção,

há um aumento na proliferação e uma diminuição da morte celular (PATEL; STEER; GORES, 1999).

Sabe-se que diversos compostos bioativos presentes em alimentos (CBAs) são capazes de modular distintos processos biológicos relacionados à carcinogênese e à quimioprevenção de neoplasias, como a proliferação celular e a apoptose (MO; ELSON, 2004); contudo, seus mecanismos de ação são pouco compreendidos (AGGARWALL; SHISHODIA, 2006). Nesse contexto, a investigação desses mecanismos contribui não somente para a elucidação de aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, como também pode ter ainda um grande impacto em estratégias de prevenção (AMES et al., 1995; DE FLORA et al., 2001).

Em revisão publicada em 1981, os epidemiologistas Doll e Peto sugeriram que seria plausível uma redução de 35% (com uma variação de 10 a 70%) na mortalidade por neoplasias malignas nos EUA somente através de modificações realizadas na alimentação. Em 1997, a World Cancer Research Foundation e o American Institute for Cancer Research, ressaltaram que a incidência de neoplasias malignas no mundo pode ser reduzida em 30-40%, por meio de modificações alimentares e em determinados estilos de vida. Essas organizações estipularam, ainda, em 2001, que a ingestão diária de no mínimo 400 a 600 g de frutas e hortaliças reduz a incidência de uma variedade de neoplasias malignas em no mínimo 20%, desde que implementada por um período prolongado (NOWELL; AHN; AMBROSNE, 2004).

Desse modo, a quimioprevenção vem a ser uma estratégia promissora para o controle de neoplasias. Esse termo foi utilizado pela primeira vez por Michael Sporn, em 1976, como uma forma de se prevenir a doença por meio da administração de

um ou mais compostos químicos durante as etapas iniciais pré-neoplásicas da carcinogênese, ou seja, na fase de iniciação ou promoção, e antes do estabelecimento da etapa de progressão (SPORN et al., 1976; LEE; PARK, 2002).

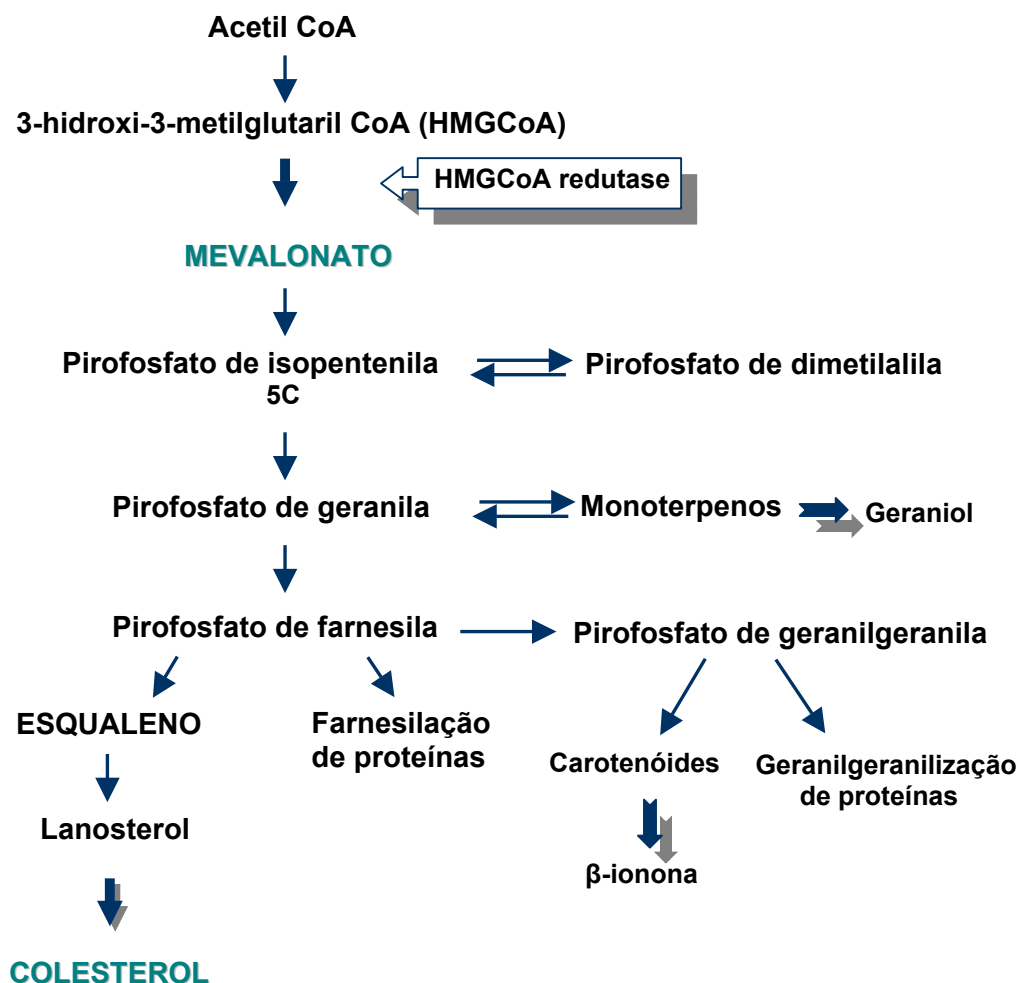
Dentre os inibidores da carcinogênese até agora identificados, pode-se citar alguns derivados do metabolismo do mevalonato em plantas, denominados isoprenóides, em função de sua promissora ação relatada na quimioprevenção e quimioterapia do câncer (MORENO et al., 1995; CROWELL, 1999; ELSON et al., 1999; MO; ELSON, 2004).

Os isoprenóides, largamente distribuídos em frutas, hortaliças e grãos de cereais, são uma classe de substâncias com mais de 23.000 constituintes, com diferentes tamanhos, complexidades e funções (BACH, 1995; MO; ELSON, 1999; EDWARDS; ERICSSON, 1999). Estes podem ser denominados isoprenóides “puros”, que são constituídos exclusivamente por múltiplos de unidades isoprênicas (unidades de 5 carbonos), como monoterpenos (duas unidades), sesquiterpenos (três unidades), diterpenos (quatro unidades), triterpenos (seis unidades), tetraterpenos (oito unidades) e politerpenos (n unidades), enquanto que aqueles denominados “mistos” apresentam apenas parte de suas moléculas derivada da via do mevalonato (BACH, 1995; SACCHETTINI, 1997; ELSON et al. 1999).

Como demonstrado na Figura 1, através da via do mevalonato é formado um número excepcional de isoprenóides, podendo-se citar dentre eles o monoterpeno  $\alpha$ -limoneno, presente em óleos essenciais da laranja e outras frutas cítricas; álcool perilílico presente na cereja e hortelã; beta-ionona (BI) presente em uvas e aromatizantes de vinhos, e o geraniol (GR) presente em óleo de erva-cidreira, um ingrediente constituinte de chás de plantas (STERMER et al., 1994).

A primeira etapa na biossíntese de isoprenóides em plantas e do colesterol em animais é um conjunto de reações que se inicia com a formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA), que é reduzida a mevalonato. A síntese do mevalonato consiste na etapa crítica desse metabolismo, sendo catalisada pela enzima HMG-CoA redutase (STRYER, 1988).

Após sua síntese, o mevalonato é convertido em pirofosfato de isopentenila ( $C_5$ ), ou seja, em uma unidade isoprênica. Adições sucessivas de unidades isoprênicas formam o pirofosfato de geranila ( $C_{10}$ ) e pirofosfato de farnesila ( $C_{15}$ ). A partir deste momento, a via metabólica se divide: o pirofosfato de farnesila resulta em cadeias com quantidades aumentadas de unidades isoprênicas, como fitol ( $C_{20}$ ), dolicol ( $C_{70-120}$ ) e borracha ( $C_{2800-20.000}$ ), enquanto que o pirofosfato de geranila envolve a ligação de 2 moléculas de pirofosfato de farnesila, formando o esqualeno ( $C_{30}$ ), que, por sua vez, é convertido ao lanosterol. O colesterol é formado a partir do lanosterol após várias etapas, incluindo a perda de 3 grupamentos metila (STRYER, 1988; KOOLMAN; ROHM, 1996; MO; ELSON, 1999).

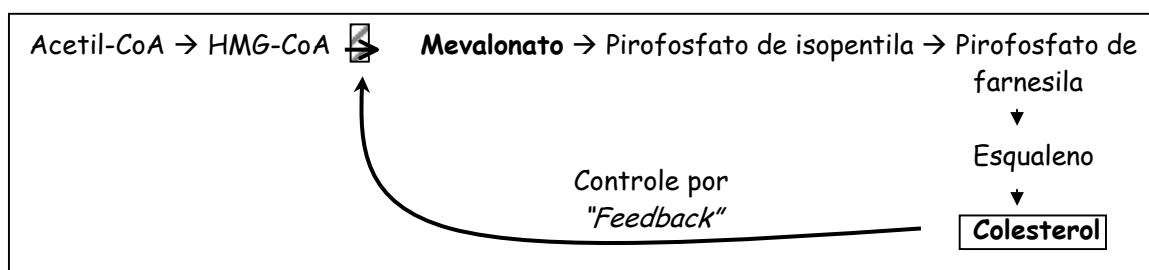


Adaptada de Crowell et al., 1991; Bach, 1995; Elson, 1995.

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

Sabe-se que o colesterol e isoprenóides desempenham um papel crítico na proliferação de células eucarióticas (SIPERSTEIN, 1984). O colesterol é um componente das membranas nuclear, mitocondrial e de microssomos, bem como da membrana plasmática. Dessa forma, é relevante seu papel na proliferação celular. A síntese do colesterol pode ser regulada por meio de “*feedback*”, ou seja, quando o ácido mevalônico não está disponível, sua síntese é aumentada e a homeostase do

colesterol, bem como de compostos isoprênicos, é mantida (COLEMAN; LAVIETES, 1981; SIPERSTEIN, 1984).



Fonte: SIPERSTEIN, 1984

**Figura 2.** Via da síntese de isoprenóides.

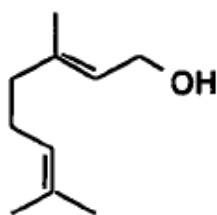
A regulação da HMGCoA-redutase é multivalente, sendo reprimida por produtos esteróis como o colesterol, e não esteróis, derivados do metabolismo do mevalonato (GOLDSTEIN; BROWN, 1990). Os mecanismos de controle da atividade dessa enzima podem envolver a inibição parcial da transcrição do DNA por meio 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; BROWN, 1990; MAYER et al., 1991).

No entanto, lesões pré-neoplásicas e neoplásicas hepáticas (SIPERSTEIN, 1984), bem como tecidos de outras neoplasias (SIPERSTEIN, 1964; ELSON et al., 1999; TATMAN; MO, 2002; MCANALLY et al., 2003) apresentam perda do mecanismo de retro-regulação inibitória da atividade da enzima HMG-CoA redutase. Contudo, é maior a sensibilidade da enzima HMG-CoA redutase à regulação

inibitória dos isoprenóides em tecidos neoplásicos do que em tecidos esterologênicos. Em consequência de tal inibição, limitar-se-ia a disponibilidade de intermediários derivados da via do mevalonato, necessários à modificação pós-tradução de proteínas relacionadas com a proliferação celular (ELSON, 1995; ELSON et al., 1999; TATMAN; MO, 2002; MCANALLY et al., 2003, SIDDALS et al. 2004). Esta poderia ser uma possível explicação para a atividade inibitória do desenvolvimento de neoplasias, constatada após administração de isoprenóides (ELSON, 1995; MORENO et al., 1995; ELSON et al., 1999).

Em trabalhos anteriores de nosso grupo, observou-se atividade quimiopreventiva do GR e da BI quando administrado durante a fase de iniciação e promoção inicial da hepatocarcinogênese em ratos submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente. A ação quimiopreventiva por parte do GR foi atribuída à inibição da proliferação celular e indução da apoptose (ONG et al., 2006), enquanto a atividade quimiopreventiva da BI foi atribuída à inibição da proliferação celular nas LPN e nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN (ESPÍNDOLA et al., 2006). Contudo, apesar da existência de alguns trabalhos na literatura demonstrando a atividade antineoplásica desses compostos *in vitro*, não há relatos sobre a ação dessas substâncias durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese *in vivo*.

O GR é um monoterpene acíclico encontrado naturalmente em óleos de plantas aromáticas como a erva cidreira (Figura 3) (CARNESECCHI et al., 2002). Este composto foi inclusive classificado como substância geralmente reconhecida como segura (GRAS), e aprovado para uso como aditivo alimentar (FEMA 2624, apud YU et al., 1995).



Fonte: Tatmam, Mo, 2002

**Figura 3.** Estrutura química do isoprenóide acíclico geraniol.

Em diversos estudos *in vitro* realizados com células de câncer de cólon (Caco-2), mama (MCF-7), leucemia (P388), hepatomas (Morris 7777), melanomas (B16) e células HepG2 de hepatocarcinoma, observou-se atividades antineoplásicas após a administração de GR (SHOFF et al., 1991; YU et al., 1995; CARNESECCHI et al., 2001; TATMAN; MO, 2002; CARNESECCHI et al., 2002; DUNCAN et al., 2004; POLO; DE BRAVO, 2006).

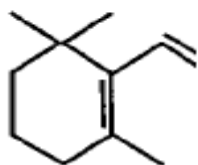
Sua ação anticarcinogênica foi atribuída principalmente à inibição da atividade da HMG-CoA redutase, levando à limitação de intermediários da via do mevalonato necessários para o processamento pós traducional (isoprenilação) de proteínas relacionadas ao crescimento celular (CLARKE, 1992; ELSON; YU, 1994; ELSON, 1995; YU; HILDEBRANDT; ÉLSON, 1995; CARNESECCHI, 2002).

Além disso, o GR destaca-se por ser o único isoprenóide que modifica não somente os níveis pós-tradução da enzima HMG-CoA redutase, mas também reduz os níveis de RNAm para esta proteína (PEFFLEY; GAYEN, 2003). Sendo assim, convém ressaltar que, de modo geral, terpenos não regulam a transcrição de genes que respondem a esteróis, como é o caso da HMG-CoA redutase. Desta forma, o



GR parece apresentar propriedades análogas às cadeias de esteróis que regulam os níveis de RNAm (PEFFLEY; GAYEN, 2003).

Já a BI é um sesquiterpeno presente na estrutura molecular do retinol,  $\beta$ -caroteno e ácido retinóico (Figura 4). Este composto representa uma subclasse dos isoprenóides cíclicos (MO; ÉLSON, 1999).



Fonte: Tatmam, Mo, 2002

**Figura 4.** Estrutura química do isoprenóide cíclico  $\beta$ -ionona.

O tratamento com BI demonstrou suprimir a proliferação de células B16 de melanoma e células MCF-7 e MDA-MB-231 mamárias (ELSON, 1995; HE et al., 1997; MO; ELSON, 1999). Esta inibição foi atribuída tanto à supressão da divisão celular como ao estímulo da apoptose. Além disso, a BI modulou a atividade da enzima HMG-CoA redutase via ações pós-tradução (MO; ELSON, 1999).

Conforme estudo desenvolvido por Mo e Élson em 1999, linhagens de células tumorais diferem substancialmente em sua resposta à BI, variando os valores de IC50 entre 35  $\mu$ mol/L em células HL-60 e 160  $\mu$ mol/L em CCD-18Co (MO; ELSON, 1999).

Estudo realizado por Liu et al. (2004) com células SGC-7901 de adenocarcinoma gástrico humano, demonstrou a inibição do crescimento dessas células após tratamento com BI, de forma dose-dependente. Foi verificado também

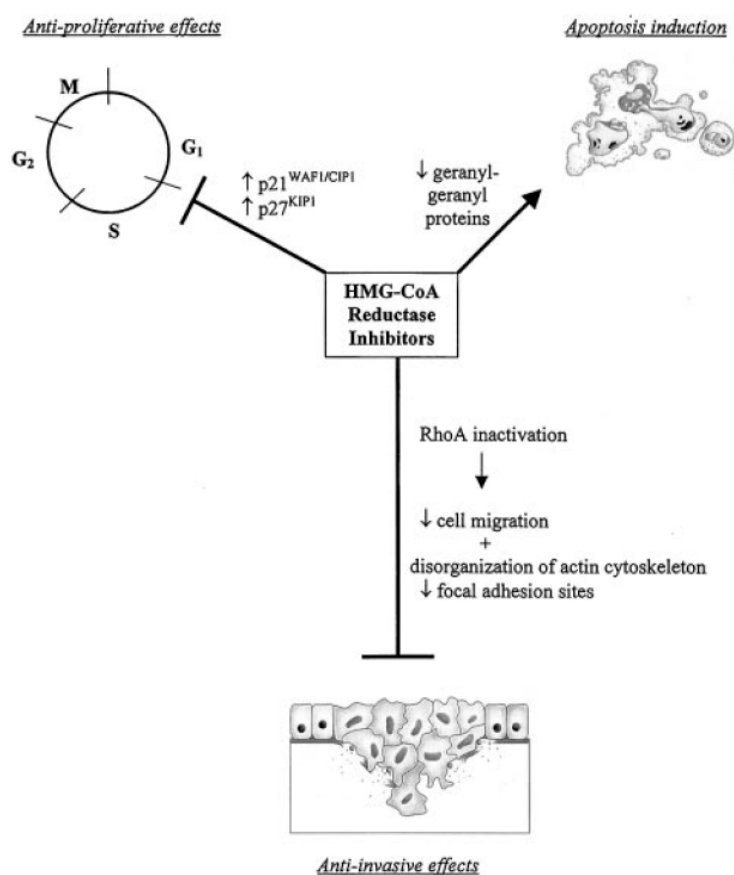
que este composto é capaz de influenciar metástases, por meio da hiperexpressão de metaloproteinases 1 e 2 (importantes enzimas da membrana celular). O mesmo grupo observou nesta linhagem indução da apoptose após administração da BI. No entanto, os mecanismos pelos quais o isoprenóide exerce estas atividades ainda requerem mais investigações.

Descreve-se na literatura que a atuação conjunta de isoprenóides pode favorecer a modulação de mecanismos relacionados à carcinogênese, de forma aditiva ou sinérgica. Trabalhos demonstraram que isoprenóides com estrutura cíclica, associada a isoprenóides com estrutura acíclica, poderiam estimular a degradação da enzima HMG-CoA redutase por meio da elevação de farnesol celular, ou, ainda, atuando como homólogos deste (CLEGG, et al., 1982; PARKER, et al., 1993).

Estudos de He et al. (1997) demonstraram um efeito aditivo e potencialmente sinérgico dos isoprenóides BI (cíclico) e  $\gamma$ -tocotrienol (acíclico) quando associados e administrados em cultura de células de melanoma, diminuindo o potencial de crescimento dessas células. Entretanto, a associação de dois isoprenóides com estruturas cíclicas - o carvacrol e a BI - não produziu resposta aditiva ou sinérgica, resultando em um efeito menor do que o esperado. Da mesma forma, Mo e Elson (1999), ao avaliarem *in vitro* a associação entre BI e outros derivados isoprênicos com estrutura cíclica, também não observaram um efeito sinérgico ou aditivo, sugerindo que a associação de compostos com estruturas similares possa estar relacionada a uma possível atenuação da ação supressora de tumor do isoprenóide considerado mais potente, por ação do membro menos potente.

De forma geral, as ações antineoplásicas de isoprenóides têm sido relacionadas à inibição da proliferação celular e estímulo da apoptose, decorrentes

da supressão da via do mevalonato em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas (Figura 5) (OHIZUMI et al., 1995; ELSON, 1995; HE et al., 1997; MO; ELSON, 1999; DUNCAN et al., 2004). Mais especificamente, descreve-se que a retroalimentação inibitória da atividade da enzima HMG-CoA redutase por isoprenóides, com conseqüente redução da produção de pirofosfato de farnesila e de geranylgeranila, resultaria em menor modificação pós-tradução de proteínas da superfamília Ras e conseqüente menor ativação protéica e bloqueio do ciclo celular na fase G<sub>1</sub>. Células que prosseguissem no ciclo celular seriam eliminadas pela apoptose (WATTENBERG et al., 1989; ELSON, 1995; HE et al., 1997; LIU et al., 2004; MO; ELSON, 2004; DUNCAN et al., 2004).



Fonte: Chan; Oza; Siu, 2003.

**Figura 5.** Mecanismos propostos de atividade quimiopreventiva dos moduladores da HMG-CoA redutase.

Esta modificação pós-tradução consiste na incorporação covalente de isoprenóides a proteínas específicas (processo denominado isoprenilação), resultando na correta localização dessas proteínas na membrana celular e na conseqüente ativação (MARSHALL, 1993, EDWARDS; ERICSSON, 1999). Dentre essas proteínas, são de relevância particular para a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular as proteínas da família Ras, Rho e Rab GTPases (HOLSTEIN; WOHLFORD-LENANE; HOHL, 2002; GHITTONI et al. 2005).

A isoprenilação é um tipo de modificação de proteínas intracelulares que envolvem a adição do isoprenóide farnesol (15 carbonos) ou, mais comumente, do geranylgeraniol (20 carbonos) a resíduos de cisteína no carbono terminal ou próximo a este. Esta ligação lipídica é requerida para a função de proteínas modificadas, como um mediador da associação à membrana ou como um determinante de modificações específicas proteína-proteína. Sendo assim, a prenilação de proteínas tem um papel crucial em processos celulares, como na transdução de sinais e em vias de tráfego intracelular (HANCOCK et al., 1989; MARSHALL, 1993; HENNEKES; NIGG, 1994; CASEY; SEABRA, 1996).

As Rho GTPases constituem um subgrupo da superfamília ras. Essa é composta por ao menos 10 proteínas distintas: RhoA, B, C, D, e E; Rac1 e 2; RacE; Cdc42Hs e TC10 (AELST; SOUZA-SCHOREY, 1997), com um papel importante na transcrição de genes, regulando vários processos celulares como a apoptose, a diferenciação e a proliferação (SCITA et al., 2000; DANESH et al., 2002; TOKSOZ; MERDEK, 2002; BENITAH et al., 2004).

O aumento quantitativo e qualitativo da atividade das proteínas Rho tem sido implicado na carcinogênese de diferentes tecidos, inclusive na hepatocarcinogênese (DURKIN et al., 2002; BENITAH et al., 2004). Uma hiperexpressão de RhoA, mais

especificamente, tem sido associada a um maior potencial metastático em neoplasias humanas (LI et al., 2006). Além disso, estudos têm demonstrado o papel de RhoA na ativação e regulação de NF- $\kappa$ B (AELST; SOUZA-SCHOREY, 1997; GNAD; KAINA; FRITZ, 2001; BENITAH et al., 2004), um fator de transcrição que tem sido intensamente estudado por seu papel no controle da expressão de genes envolvidos com a proliferação celular, bem como com a modulação da apoptose via proteína p53 (DEL RE et al., 2007).

Em ambos os processos de apoptose e proliferação celular, a proteína p53 atua efetivamente, exercendo sua função como supressor de tumor (KASTAN et al., 1991; STANLEY, 1995). Quanto a seu papel pró-apoptótico, inúmeros genes respondem à p53, que se liga a regiões específicas dos promotores desses genes alvos, ativando sua transcrição (KASTAN et al., 1991; STANLEY, 1995).

A proteína p53 é um supressor de tumor considerado o “guardião do genoma”. É encontrada funcionalmente inativa em cerca de 70% dos cânceres e consiste em um dos mais importantes alvos de vírus oncogênicos (BARCINSKI, 2004; YU; ZHANG, 2005).

A proteína p53 tem normalmente uma meia vida muito curta; no entanto, frente a um dano no DNA, esta é fosforilada e, conseqüentemente, tem sua conformação modificada, tornando sua molécula mais estável. Graças a esta estabilidade, passa a funcionar como um fator de transcrição nuclear (BARCINSKI, 2004). Sua presença na célula é regulada por sua degradação citoplasmática, encontrando-se em condições normais em concentrações não detectáveis no núcleo (FABBRO; HENDERSON, 2003).

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 se refere a sequestração da proteína ao nível citoplasmático. Esse seqüestro de p53 no citoplasma pode estar intimamente relacionado a uma falha na diferenciação e aumento da malignidade (MOLL et al., 1995).

Além disso, Niu, Li e Wang (2002) avaliaram a expressão de p53 em carcinomas humanos e observaram uma expressão reduzida em LPN hepáticas e hiperexpressão em HCC, indicando que a alta expressão de p53 pode estar relacionada com um pior prognóstico da carcinogênese. Essa hiperexpressão de p53 pode estar relacionada à forma mutada da proteína, atuando na inibição da apoptose e promovendo a proliferação.

Estudos com o modelo hepatocarcinogênese do RH também vêm demonstrando um acúmulo de p53 no citoplasma dos hepatócitos de LPN, sobretudo naquelas consideradas persistentes, sugerindo que características peculiares da persistência dessas lesões possam estar envolvidas, em parte, com a perda da função de p53 que acompanha seu acúmulo no citoplasma (MAZZANTINI et al., 2007).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Avaliar as atividades quimiopreventivas dos isoprenóides GR e BI quando administrados isoladamente ou em associação a ratos durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

## 2.2 Específicos

Em animais tratados ou não com OM, GR, BI ou GR+BI durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” realizou-se:

- quantificação da proliferação celular hepática;
- quantificação dos corpúsculos apoptóticos hepáticos;
- quantificação da concentração de colesterol plasmático total;
- quantificação de LPN positivas imunoistoquimicamente para a proteína p53 hepática;
- avaliação da proteína RhoA hepática.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 68 ratos machos, albinos, da linhagem Wistar, com pesos iniciais compreendidos entre 40 e 50g, obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF/IQ-USP).

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

O ensaio biológico foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais de Experimentação (Proc. nº 63, em anexo), em ambiente apropriado para condução de estudos de carcinogênese, com temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), luz (ciclo de iluminação claro-escuro de 12 h) e umidade ambiental controladas.

### **3.2 Modelo de Hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”**

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

A iniciação dos animais ocorreu pela administração intraperitoneal de uma única dose necrogênica do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN; Sigma, EUA; 20 mg/100 g de peso corpóreo [p.c.]) dissolvido em solução de NaCl a 0,9%. Após um período de recuperação de 2 semanas os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses únicas em dias consecutivos, por intubação gástrica, de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF; Sigma; 2 mg/100 g p.c.) dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho. Vinte e quatro horas após a última aplicação de 2-AAF os animais foram submetidos a um potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial a 70%, realizada de acordo com Higgins e Anderson (1931). Finalmente, 2 e 4 dias após a hepatectomia parcial os animais receberam por gavagem doses de 2-AAF (0,75 e 2 mg/100 g p.c., respectivamente) também dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho.

### **3.3 Protocolo experimental**

Após um período de aclimatação de 04 dias, 60 animais foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH e distribuídos aleatoriamente em 5 diferentes

grupos experimentais (Figura 6). Além desses, 08 animais constituíram um grupo de ratos não tratados (grupo NT), e que não foram submetidos a qualquer procedimento experimental durante todo o estudo, mas que permaneceram nas mesmas dependências em que os outros grupos experimentais até serem eutanasiados. Os demais animais foram submetidos ao modelo do RH e distribuídos conforme abaixo:

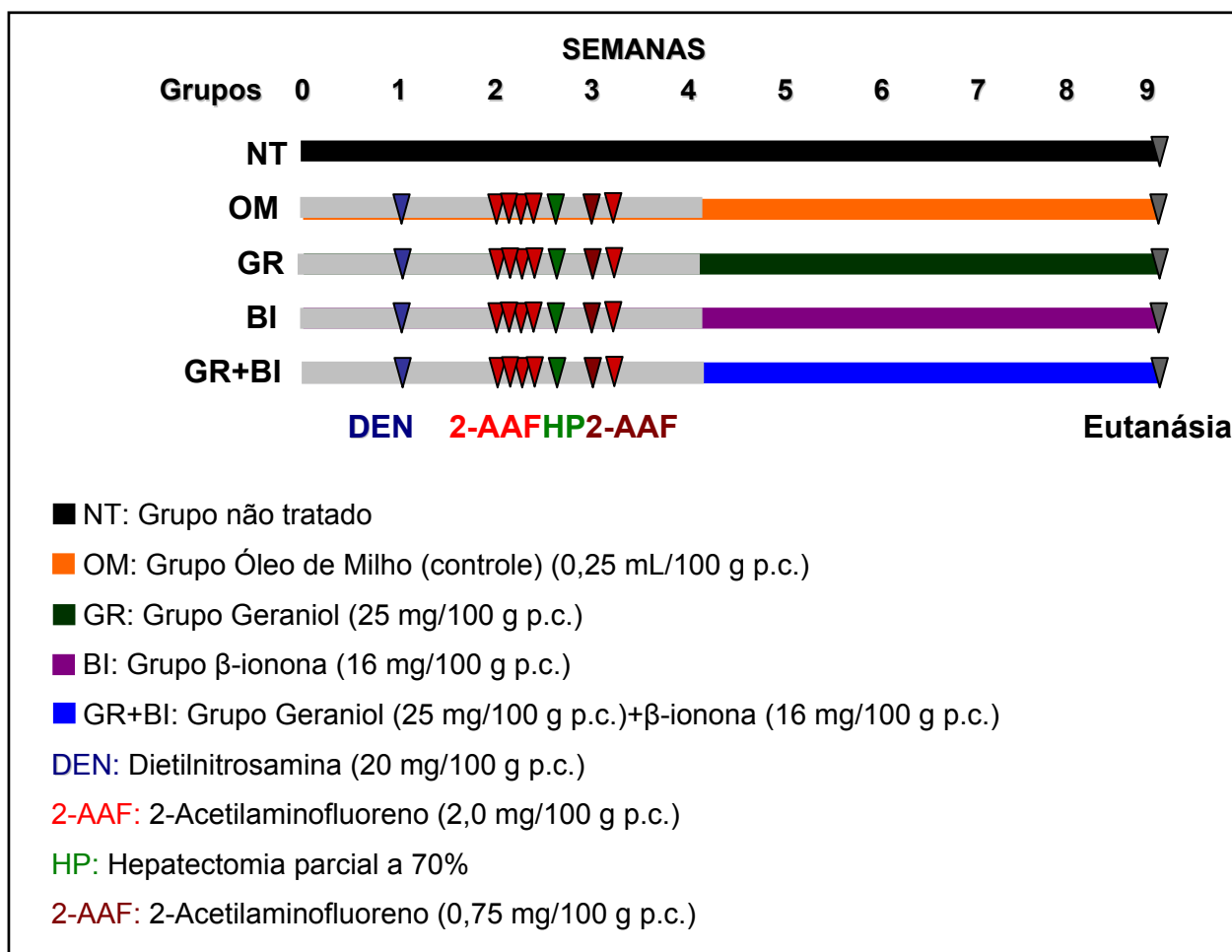
**Grupo Óleo de Milho (OM):** *grupo controle:* composto por 15 animais submetidos ao modelo do RH e tratados, por entubação gástrica, com OM (Mazola®; 0,25 mL/100 g p.c.), diariamente, a partir do 4º dia após a última dose de 2-AAF, durante 5 semanas consecutivas, até a eutanásia;

**Grupo GR:** composto por 15 animais submetidos ao modelo do RH e tratados, por entubação gástrica, com GR (98%; Sigma, EUA; 25 mg/100 g p.c.) dissolvido em óleo de milho (Mazola®; 0,25 mL/100 g p.c.), diariamente, a partir do 4º dia após a última dose de 2-AAF, durante 5 semanas consecutivas, até a eutanásia;

**Grupo BI:** composto por 15 animais submetidos ao modelo do RH e tratados, por entubação gástrica, com BI (95%; Sigma, EUA; 16 mg/100 g p.c.) dissolvido em óleo de milho (Mazola®; 0,25 mL/100 g p.c.), diariamente, a partir do 4º dia após a última dose de 2-AAF, durante 5 semanas consecutivas, até a eutanásia;

**Grupo GR+BI:** composto por 15 animais submetidos ao modelo do RH e tratados, por entubação gástrica, com BI (95%; Sigma, EUA; 16 mg/100 g p.c.) e GR (98%; Sigma, EUA; 25 mg/100 g p.c.), dissolvidos em óleo de milho (Mazola®; 0,25 mL/100

g p.c.), diariamente, a partir do 4º dia após a última dose de 2-AAF, durante 5 semanas consecutivas, até a eutanásia.



**Figura 6.** Representação esquemática do protocolo experimental.

### 3.4 Aplicação da 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) e Eutanásia dos Animais

Na noite anterior à eutanásia, as rações foram retiradas e 2 horas antes da mesma foi administrada a todos os animais, por via intraperitoneal, uma dose de 5-

bromo-2-desoxiuridina (BrdU; Sigma, EUA; 10 mg/100 g p.c.) dissolvida em PBS 1X e NaOH 1,0 N para posterior avaliação da proliferação celular por meio de análise imunohistoquímica.

Antes de serem eutanasiados, todos os animais foram pesados em balança eletrônica (ACATEC BCM 1100; São Paulo, Brasil). Em seguida, os mesmos foram anestesiados com éter etílico (Merck, Brasil). Após o início da anestesia, os ratos foram colocados em decúbito dorsal, realizando-se a laparotomia e, em seguida, a coleta de sangue por punção da artéria aorta abdominal.

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

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

### **3.5 Exame Macroscópico dos Fígados**

O fígado de cada animal foi examinado individualmente quanto à presença, em sua superfície, de formações nodulares de tamanhos variados e coloração em geral esbranquiçada ou amarelada, que se distinguiram do parênquima hepático. Após o exame da superfície, cada lobo foi seccionado em fatias de

aproximadamente 0,3 cm de espessura, sendo então, identificadas e contadas as lesões nodulares internas.

Posteriormente, foram colhidas amostras de cada lobo hepático dos animais para análise morfométrica de LPN, apoptose, proliferação e avaliação da proteína p53. Estes fragmentos de fígado foram imediatamente fixados em metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial; Merck p.a.) por aproximadamente 24 (vinte e quatro) horas.

Do lobo direito foram colhidos fragmentos para avaliação da expressão de RhoA. Esses fragmentos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e em seguida, armazenados em “freezer” a  $-80^{\circ}$  C (Revco, EUA).

### **3.6 Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas**

A análise morfométrica de LPN (focos/nódulos) foi realizada em cortes histológicos hepáticos submetidos à reação imunistoquímica para a enzima GST-P. Por convenção, denominam-se focos de hepatócitos as lesões menores do que um lóbulo hepático, enquanto nódulos de hepatócitos são lesões geralmente esféricas, ocupando área equivalente a um ou vários lóbulos hepáticos (BANNASCH; ZERBAN, 1990).

### 3.6.1 Marcação Imunoistoquímica para 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), e anticorpos secundários biotinilados anti-imunoglobulinas de coelho (Vector Laboratories, California, EUA).

Cada procedimento foi intercalado por lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fosfato (PBS-[NaCl,KCl,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 minutos em metanol (LabSynth, p.a.) contendo 25% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes (LabSynth, p.a.).

Os cortes foram incubados com o anticorpos primário anti-GSTP 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 seguida, os cortes foram incubados por 30 minutos 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 minutos

Posteriormente, foi aplicada sobre os cortes uma solução substrato de peroxidase. Esta consiste 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 minutos, contracorados pela hematoxilina e eosina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética.

### **3.6.2 Procedimento para Quantificação de LPN GST-P Positivas**

Para se quantificar o número e a área das LPN GST-P positivas foi utilizado o sistema de análise de imagem computadorizado do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Este era composto por um microscópio (Olympus; Japão) ao qual se encontrava acoplada uma câmera de vídeo (Sony, Japão) que se conectava a um microcomputador, 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 mm<sup>2</sup>, após calibração do aparelho. Além disso, as LPN GST-P positivas foram classificadas como sendo persistentes (marcação imunoistoquímica uniforme e bordas regulares) ou em remodelação (perda da uniformidade de marcação imunoistoquímica e bordas irregulares) (RIZZI et al., 1997; WOOD et al., 1999; SILVEIRA et al., 2001).



### 3.7 Quantificação da Proliferação Celular

Em cortes histológicos dos fígados obtidos por ocasião da eutanásia foi realizada dupla-marcação imunoistoquímica para BrdU e GST-P. Essa técnica possibilita a identificação de células na fase S do ciclo celular e que estas sejam classificadas quanto à sua localização que pode ser ainda diferenciada entre LPN persistentes ou em remodelação.

Para tanto, foram utilizados o “kit” de dupla-marcação imunoistoquímica Double-Stain System (Dako, Dinamarca) com os anticorpos primários: monoclonal anti-BrdU (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) e policlonal anti-GST-P (Dako, Dinamarca).

Cada procedimento foi intercalado por lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fosfato [PBS (NaCl 137 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KCl 2,68 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM e água ultra-pura, pH 7,4)].

Os cortes histológicos dos materiais incluídos em parafina foram desparafinizados em xilol e na seqüência xilol/álcool (1:1), em seguida hidratados com etanol absoluto, seguido de etanol 95%, etanol 70% e água destilada.

Após tratamento das lâminas com HCl por 1 hora, a peroxidase endógena foi bloqueada em solução de metanol (Merck, Brasil) contendo 20% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes (Merck, Brasil) por 30 minutos. Os cortes foram, então, incubados por 30 minutos com o anticorpo primário anti-BrdU na diluição de 1:400 com o respectivo diluente, e em seguida, com o polímero HRP (Horseradish Peroxidase; Dako, Dinamarca). Posteriormente, os cortes sofreram reação com o substrato cromógeno DAB (Dako, Dinamarca) e na seqüência, foram submetidos a

bloqueio da fosfatase alcalina com levamisole (Dako, Dinamarca). Em seguida, os mesmos foram incubados com o anticorpo primário anti-GST-P (1:1000) por 30 minutos, seguido pela aplicação do polímero e por fim do substrato cromógeno Fast Red (Dako, Dinamarca). Os cortes foram contracolorados pela eosina e, em seguida, pela hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética.

Para se quantificar o número de marcações para BrdU foi utilizado microscópio (Carl Zeiss Axiostar Plus, Alemanha) ao qual se encontrava acoplada uma câmera de vídeo (Pixelink Megapixel FireWier camera 3.2, Alemanha) que se conectava a um microcomputador equipado com o programa Axio Vision 40V 4.5 (Carl Zeiss, Alemanha). A leitura das lâminas foi realizada varrendo-se toda a extensão dos fragmentos, utilizando-se objetiva de 40 X, e o resultado foi expresso como número de hepatócitos positivos para BrdU/mm<sup>2</sup> de área de LPN persistentes ou em remodelação, ou área de tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas, tanto dos grupos submetidos ao modelo do RH, como do NT.

### **3.8 Quantificação da Apoptose**

A análise da apoptose em cortes histológicos das amostras hepáticas obtidas foi baseada no método de microscopia de fluorescência descrito por Stinchcombe et al. (1995). Para tanto, foi utilizado microscópio de epifluorescência (Nikon, Japão), do Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia da FMVZ-USP.

O método está baseado na observação de que corpúsculos apoptóticos apresentam intensa fluorescência da eosina em cortes histológicos de fígado corados com hematoxilina e eosina (H&E). De acordo com os autores, essa 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 dessa metodologia específica permite também localizar pequenos corpúsculos apoptóticos que não seriam normalmente identificados utilizando-se luz normal. Esse fato, 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. Em caso de dúvida a respeito 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.

Os cortes histológicos corados com H&E foram analisados utilizando-se objetiva de 40X e a medida em que se localizava 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), ou seja, corpúsculos acidofílicos arredondados de coloração rósea, que se encontravam separados das células ao redor, podendo ainda, apresentar núcleo fragmentado. Os resultados foram expressos como número de corpúsculos apoptóticos/mm<sup>2</sup> de área de LPN positivas para GST-P persistente ou em remodelação e tecido ao redor da mesma sem alterações morfológicas, ou de tecido hepático normal (ONG et al., 2006).

### **3.9 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 da eutanásia 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 foi realizado conforme o indicado pelo fabricante. Foi realizada a leitura espectrofotométrica (U 3410, Hitachi, Japão) das amostras a 500 nm. Todas as determinações de colesterol total foram realizadas em triplicata.

### **3.10 Análise da expressão da proteína p53**

Para a marcação imunoistoquímica com o anticorpo anti-p53, utilizou-se o kit de marcação ImmunoCruz Staining Systems (Santa Cruz Biotechnology), conforme manual do fabricante. Basicamente, as lâminas com cortes histológicos hepáticos foram incubadas com o anticorpo primário diluído na concentração de 1:100, e incubado por 2 horas. Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em anticorpo secundário biotilado, sendo posteriormente incubadas em complexo HRP-streptavidina. A coloração foi desenvolvida com o substrato 3,3'-diaminobenzidina (Sigma). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina,

desidratadas e montadas em Permount (Fisher Scientific). A especificidade das marcações foi controlada subtraindo-se o anticorpo primário ou substituindo-o por soro de cabra não imunizada. Em todos os casos isto resultou em ausência de marcação. Além disso, utilizou-se lâmina de controle positivo de marcação para p53, DO-7, carcinoma de célula escamosa (DakoCytomation, Carpinteria), gentilmente doada pela Prof<sup>a</sup>. Maria Lúcia Zaidan Dagli (FMVZ-USP), na qual foi comprovada a eficácia e a especificidade da metodologia empregada para a marcação de p53.

### **3.11 Análise da proteína RhoA**

#### **3.11.1 Preparação dos Extratos protéicos**

Para a preparação do extrato protéico de membrana celular das amostras de fígado dos ratos do experimento, foi utilizado o reagente para extração de proteína de membrana MEM-PER (Pierce, Rockford), que se baseia na lise das células com um detergente específico, sendo, posteriormente, as proteínas de membrana solubilizadas com um segundo detergente. Esta reação foi incubada a 37°C para separação das proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas em fases distintas. Basicamente, foram pesados cerca de 10 mg de tecido hepático obtendo-se ao final do processo proteínas de membrana. Para quantificação da concentração de proteínas, foi utilizado o método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay).

### 3.11.2 Western Blot

Os extratos de proteína de membrana foram submetidos separadamente à eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE) a 15% e tampão Tris-glicina 1X (Método de Laemmli). As proteínas foram então transferidas por meio de eletroforese do gel para membrana de nitrocelulose Hybond-CTM (Amersham Biosciences, EUA). O bloqueio da membrana de nitrocelulose foi feito com PBS contendo 5% de leite em pó (PBS-L), durante uma noite a 4° C. A membrana foi lavada em PBS-T e incubada com o anticorpo primário anti-RhoA (Upstate, USA) (na diluição de 1:1000), diluído em tampão PBS contendo 0.3% de albumina em pó, por duas horas à temperatura de 37°C. Após nova lavagem com PBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP), e a imunodeteccção foi feita utilizando-se o sistema de quimioluminescência ECL (Amersham Pharmacia Biotec). A membrana foi exposta a filme de raios-X, resultando em bandas de aproximadamente 24 kDa (AMA et al., 2005), o que corresponde ao peso molecular esperado da proteína RhoA. Para se quantificar as intensidades das bandas, utilizou-se um densitômetro BIO-RAD (Modelo GS-700 Imaging Densitometer, BIO-RAD, EUA) com software específico (Molecular Analyst, BIO-RAD, EUA). Os sinais foram quantificados em unidades arbitrárias. A membrana foi corada com Comassie Blue (Pierce, Rockford), e os dados foram normalizados utilizando-se o sinal correspondente deste corante para corrigir as variações no carregamento das proteínas (TAO et al., 2002; ESPÍNDOLA et al., 2005; ONG et al., 2006).

### 3.12 Análise Estatística

Para a realização da análise estatística utilizou-se o programa GraphPad InStat versão 3.05 (San Diego, Califórnia, USA). Todos os dados foram testados quanto à distribuição normal (teste de Kolmogorov e Smirnof) e à homogeneidade de variância (teste de Bartlett). As comparações entre os cinco grupos experimentais, quando os dados apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, foram realizadas pelo teste one-way ANOVA, seguido do teste de Tukey. Nos casos em que a distribuição dos dados não se apresentou normal ou sem homogeneidade de variância, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. Para comparações entre dois dados dependentes foi utilizado o teste Wilcoxon. Para a análise dos dados referentes ao percentual de LPN positivas para p53, utilizou-se o teste Qui-quadrado. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Em todos os casos, o nível de confiança adotado foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Pesos corpóreos inicial e final, bem como pesos dos fígados de ratos tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”

A Tabela 1 apresenta os resultados referentes aos pesos corpóreo inicial e final e pesos dos fígados de ratos do grupo NT ou tratados com OM (grupo controle), GR, BI ou GR+BI durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

**Tabela 1.** Pesos corpóreo inicial e final, peso absoluto e relativo dos fígados de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

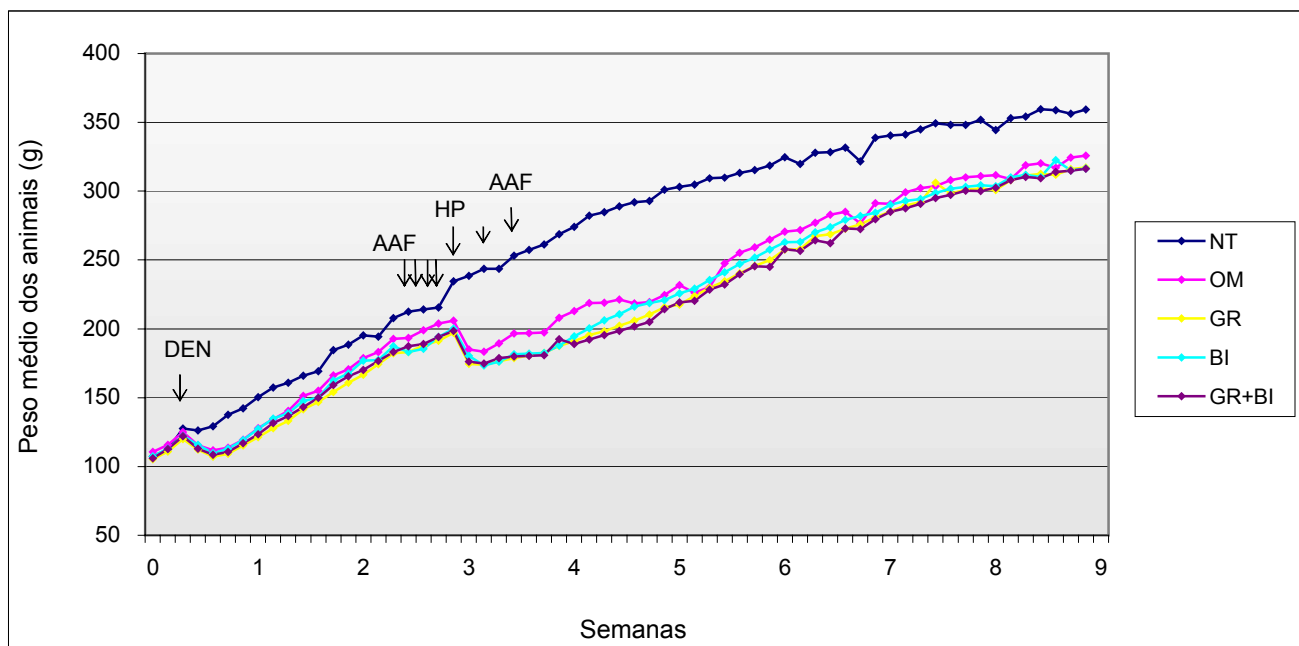
| Grupos | N°<br>animais | Peso corpóreo |            | Peso<br>absoluto do<br>fígado (g)* | Peso relativo<br>do fígado<br>(g/100g p.c.)* |
|--------|---------------|---------------|------------|------------------------------------|--|
|        |               | Inicial (g)*  | final (g)* |                                    |  |
| NT     | 8             | 58±9          | 341±30     | 9,3±1,0                            | 2,7±0,2                                      |
| OM     | 8             | 58±4          | 308±26     | 11,2±2,3                           | 3,6±0,6                                      |
| GR     | 11            | 58±3          | 298±20     | 9,9±1,3                            | 3,3±0,2                                      |
| BI     | 12            | 57±3          | 297±22     | 10,5±2,1                           | 3,5±0,5                                      |
| GR+BI  | 12            | 57±3          | 297±22     | 11,1±1,3                           | 3,7±0,5                                      |

NT = não tratados; OM = óleo de milho (controle); GR = geraniol; BI =  $\beta$ -ionona; GR+BI = geraniol +  $\beta$ -ionona; n = número de animais; p.c. = peso corpóreo; \*média  $\pm$  desvio-padrão.



Observa-se que o peso médio inicial foi bastante semelhante entre os grupos, denotando uma aleatorização adequada dos animais ao início do experimento. Além disso, não se observou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os 5 grupos quanto aos pesos corpóreo inicial e final, bem como os pesos absoluto e relativo dos fígados dos animais. Dessa forma, esses dados sugerem que as doses administradas de GR (25 mg/100g p.c.) e BI (16 mg/100g p.c.) isoladamente ou em associação, não exerceram toxicidade digna de nota.

Pode-se observar na Figura 7 a evolução ponderal dos animais durante as 9 semanas de experimento.

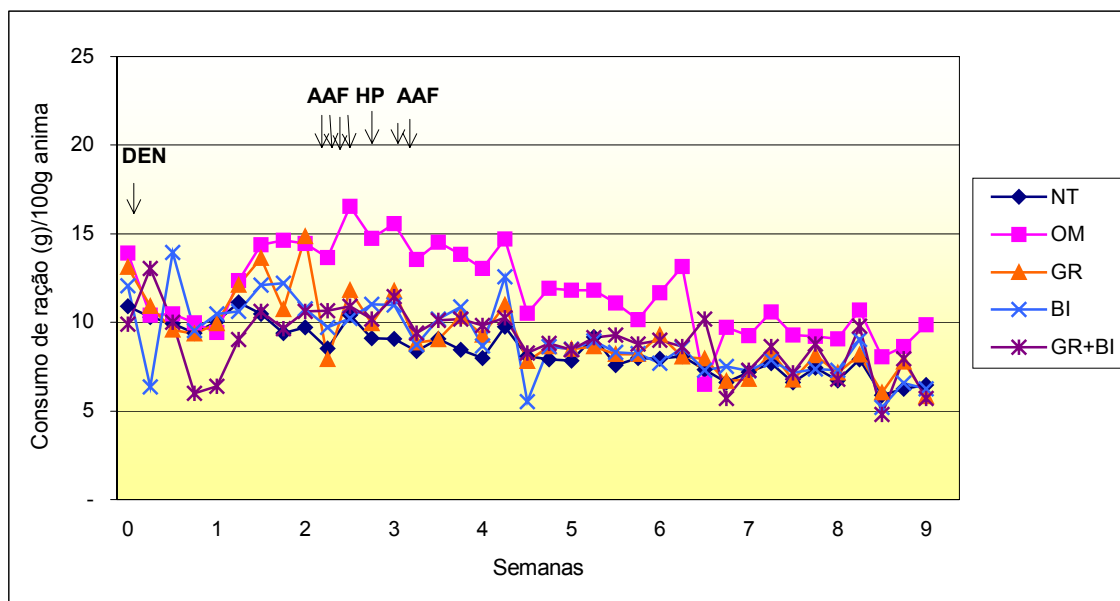


NT = não tratados; OM: grupo óleo de milho (controle); GR: grupo geraniol; BI: grupo  $\beta$ -ionona; GR+BI: grupo geraniol+ $\beta$ -ionona; DEN: dietilnitrosamina; 2-AAF: 2-acetilaminofluoreno; HP: hepatectomia parcial a 70%.

**Figura 7.** Evolução ponderal de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente".

A perda de peso observada nos grupos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese, logo após a administração intraperitoneal da DEN e do procedimento da hepatectomia a 70%, bem como a manutenção deste durante o período de tratamento com 2-AAF, são indícios de que a aplicação do modelo ocorreu adequadamente. A taxa de mortalidade durante o período experimental foi de 46% no grupo OM, 26% no grupo GR e 20% nos grupos BI e GR+BI, considerando-se aqueles animais mortos por ocasião da hepatectomia.

Na Figura 8 observa-se os resultados referente ao consumo alimentar (g de ração/100g animal) dos animais durante as 9 semanas de experimento.



NT = não tratados; OM = grupo óleo de milho (controle); GR = grupo geraniol; BI = grupo  $\beta$ -ionona; GR+BI = grupo geraniol+ $\beta$ -ionona.

**Figura 8.** Consumo alimentar de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente".

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o consumo de ração dos animais submetidos ao protocolo experimental de hepatocarcinogênese e os animais não tratados ( $p > 0,05$ ). Além disso, não houve diferença entre o consumo de ração dos grupos GR, BI e GR+BI quando comparado aos animais do grupo controle ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2 Análise macroscópica dos fígados de ratos tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”

Por ocasião da eutanásia, os fígados foram analisados macroscopicamente para detecção de nódulos presentes na superfície e ao corte do tecido hepático (Tabela 2).

**Tabela 2.** Incidência e multiplicidade de nódulos visíveis à macroscopia dos fígados de ratos Wistar tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

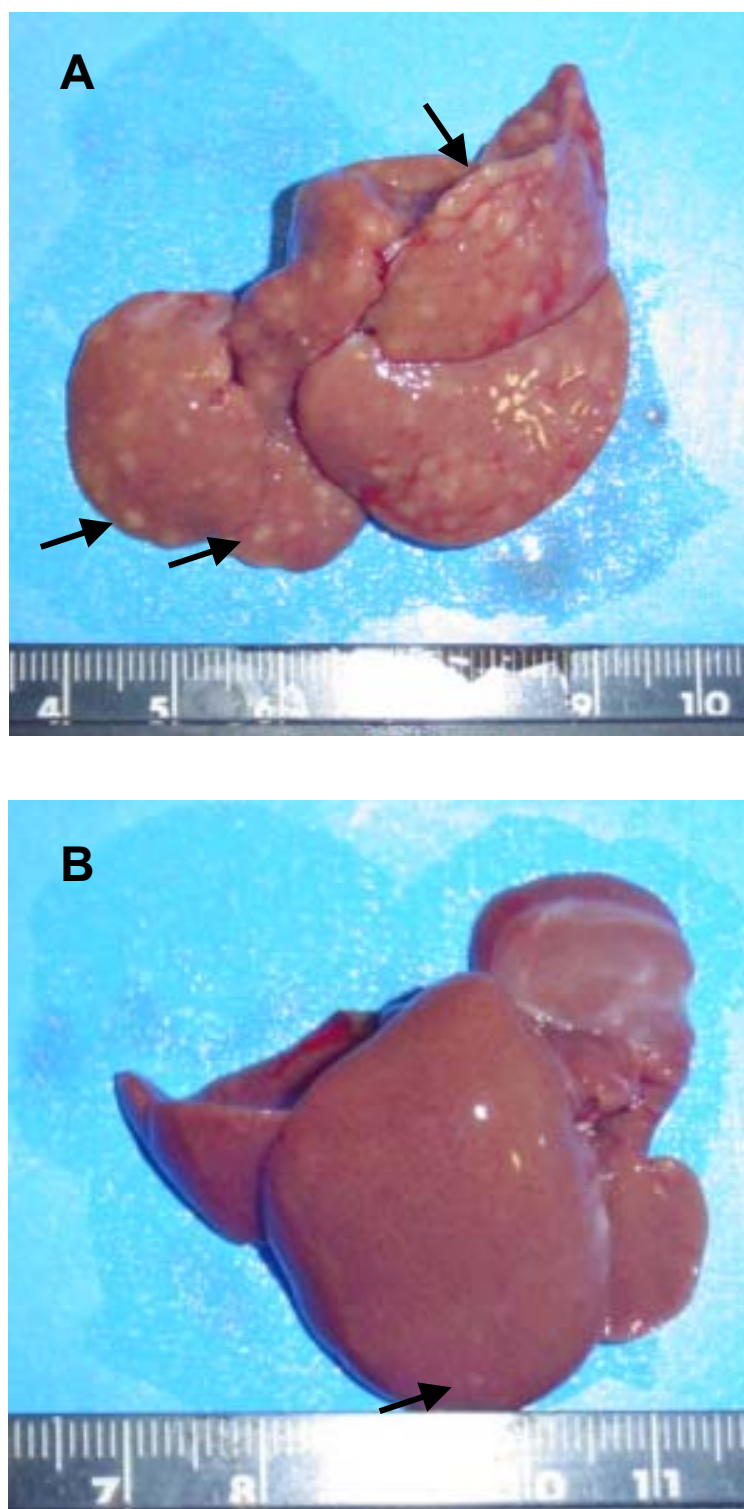
| Grupo | Ratos com LPN | Incidência de nódulos (%) | Multiplicidade*          |
|-------|---------------|---------------------------|--------------------------|
| OM    | 8/8           | 100                       | 188 $\pm$ 138            |
| GR    | 11/11         | 100                       | 87 $\pm$ 98              |
| BI    | 12/12         | 100                       | 77 $\pm$ 90 <sup>a</sup> |
| GR+BI | 12/12         | 100                       | 90 $\pm$ 82              |

OM = óleo de milho (controle); GR = geraniol; BI =  $\beta$ -ionona; GR+BI = geraniol e  $\beta$ -ionona; \*média  $\pm$  desvio-padrão.

<sup>a</sup>diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo OM (controle) ( $p < 0,05$ ), segundo o teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

Em comparação ao grupo OM, o grupo BI apresentou menor ( $p < 0,05$ ) multiplicidade de nódulos macroscopicamente visíveis. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos OM, GR e GR+BI quanto à multiplicidade de LPN. Além disso, não houve diferença entre os grupos OM, GR, BI e GR+BI quanto à incidência de nódulos hepáticos.

A Figura 9 apresenta a digitalização de fotografia de nódulos macroscopicamente visíveis no fígado de um animal do grupo OM (A) e no fígado de um animal do grupo BI (B).



**Figura 9.** Digitalização de fotografias do fígado de ratos Wistar tratados com óleo de milho (A) ou  $\beta$ -ionona (B) durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

### **4.3 Análise morfométrica de LPN hepáticas marcadas positivamente para a enzima GST-P de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”**

A Tabela 3 apresenta os dados referentes à análise morfométrica das LPN hepáticas marcadas positivamente para a enzima GST-P de ratos tratados com GR, BI ou GR+BI, incluindo o número (número médio/mm<sup>2</sup>) de LPN persistentes e em remodelação, o percentual de LPN em remodelação, a área média (mm<sup>2</sup>) de LPN persistentes e em remodelação e o percentual da área do corte histológico hepático ocupado por estas lesões.



**Tabela 3.** Análise morfológica de LPN hepáticas persistentes e em remodelação de ratos Wistar tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

| Grupos | Número LPN/cm <sup>2</sup> |                     | % LPN em remodelação* | Área das LPN (mm <sup>2</sup> ) |                        | % Área do corte histológico |                     |
|--------|----------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------|
|        | LPN persistentes*          | LPN em remodelação* |                       | LPN persistentes*               | LPN em remodelação*    | LPN persistentes*           | LPN em remodelação* |
| OM     | 12±13                      | 62±18               | 84±13                 | 0,49±0,31                       | 0,39±0,20              | 7±10                        | 25±13               |
| GR     | 4±3 <sup>a</sup>           | 52±18               | 94±6 <sup>a</sup>     | 0,40±0,30                       | 0,25±0,12              | 2±2                         | 12±7 <sup>b</sup>   |
| BI     | 2±3 <sup>a</sup>           | 92±44               | 98±3 <sup>a</sup>     | 0,33±0,61                       | 0,22±0,15 <sup>b</sup> | 1±3 <sup>a</sup>            | 16±9                |
| GR+BI  | 3±5 <sup>a</sup>           | 66±26               | 95±5 <sup>a</sup>     | 0,42±0,34                       | 0,27±0,15              | 2±3                         | 17±9                |

OM = óleo de milho (controle); GR = geraniol; BI =  $\beta$ -ionona; GR+BI = geraniol e  $\beta$ -ionona; LPN = lesões pré-neoplásicas; \*média  $\pm$  desvio-padrão.

<sup>a</sup> diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo OM (controle) ( $p < 0,05$ ), segundo o teste de Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup> diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo OM (controle) ( $p < 0,05$ ), segundo o teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

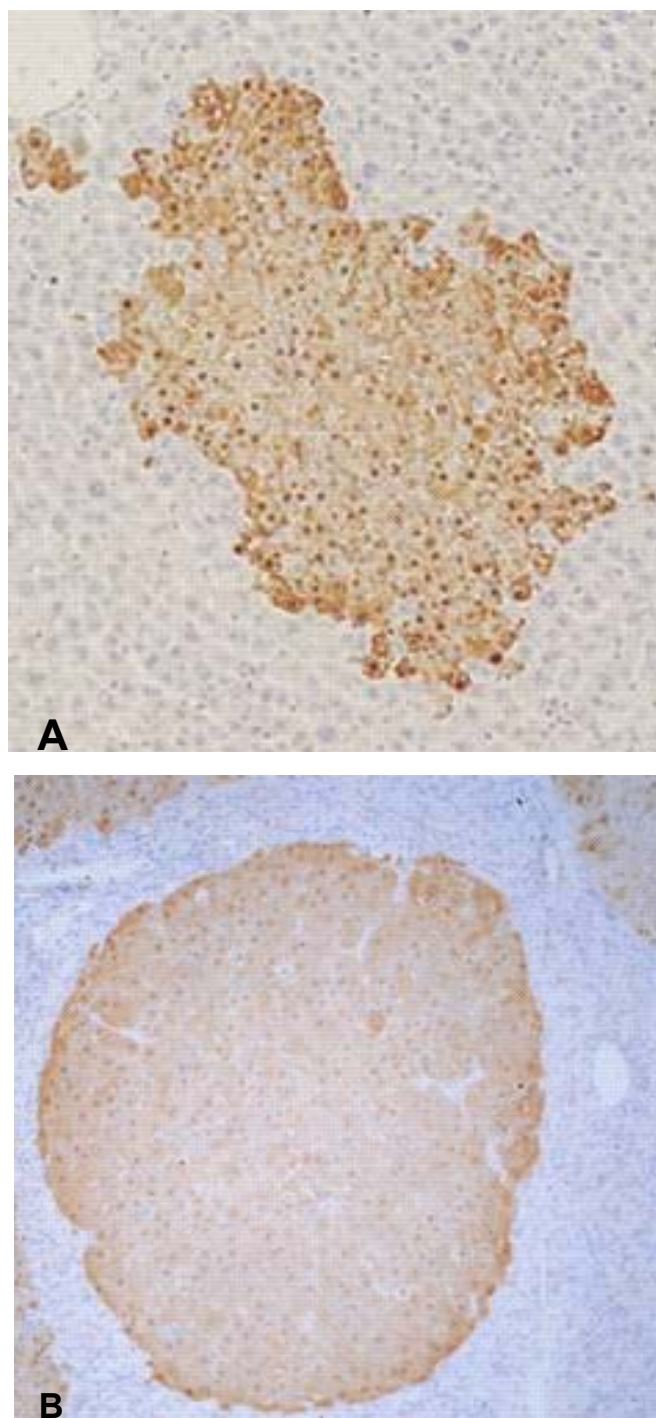


Em comparação ao grupo OM (controle), os grupos GR, BI e GR+BI apresentaram um menor ( $p < 0,05$ ) número de LPN persistentes. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número de LPN em remodelação entre os grupos OM, GR, BI e GR+BI. Já os grupos GR, BI e GR+BI apresentaram um maior ( $p < 0,05$ ) percentual de LPN em remodelação em comparação ao grupo OM.

As áreas das LPN persistentes não diferiram estatisticamente entre os grupos OM, GR, BI e GR+BI. O grupo BI apresentou LPN em remodelação com menor ( $p < 0,05$ ) área quando comparado ao grupo controle. Não foi observada diferença neste parâmetro entre os grupos OM, GR e GR+BI.

Também em comparação ao grupo OM (controle), o grupo BI apresentou menor porcentagem da área dos cortes histológicos ocupados por LPN persistentes ( $p < 0,05$ ), enquanto o grupo GR apresentou menor porcentagem da área dos cortes histológicos ocupados por LPN em remodelação ( $p < 0,05$ ). Ainda em comparação ao grupo OM, não houve diferença entre a área dos cortes histológicos ocupada por LPN persistentes nos grupos GR e GR+BI, bem como não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a área dos cortes histológicos ocupada por LPN em remodelação nos grupos BI e GR+BI.

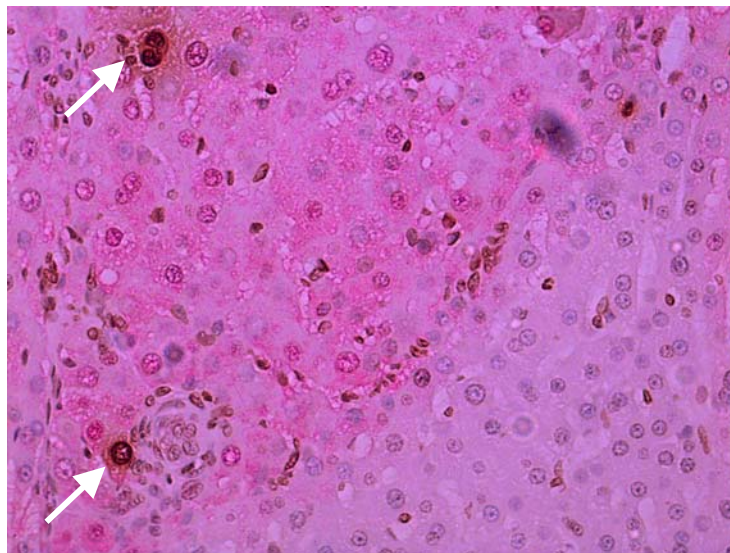
Na Figura 10 observa-se a digitalização de fotografia de uma LPN persistente e uma em remodelação.



**Figura 10.** (A) Marcação imunoistoquímica de LPN GST-P positivas em remodelação (objetiva de 20X) e (B) persistente (objetiva de 10X), de fígado de rato submetido ao modelo do “Hepatócito Resistente”.

#### **4.4 Quantificação da proliferação celular hepática de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”**

A análise da proliferação celular foi realizada por meio de técnica de dupla marcação imunistoquímica para BrdU e para a enzima GST-P em cortes histológicos hepáticos. Esta dupla-marcação possibilitou a identificação de células positivas para BrdU e sua localização dentro ou fora das LPN (Figura 11). Como controle positivo do método, realizou-se marcação imunistoquímica de BrdU em cortes de duodenos de ratos dos diferentes grupos experimentais. Como controle negativo, a imunistoquímica foi realizada sem a aplicação do anticorpo primário (anti-BrdU).



**Figura 11.** Corte histológico hepático de rato Wistar marcado imunistoquimicamente para BrdU e GST-P. As setas indicam a presença de células marcadas positivamente para BrdU dentro de uma LPN. Objetiva: 40X.

Na Tabela 4 observa-se o número médio/mm<sup>2</sup> de células marcadas positivamente para BrdU localizadas nas LPN persistentes ou em remodelação, bem como nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN.

**Tabela 4.** Marcação de células BrdU positivas nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN e em LPN persistentes e em remodelação de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

| Grupos | Número de células positivas para BrdU/mm <sup>2</sup> |                    |                     |
|--------|---|--------------------|---------------------|
|        | Área ao redor das LPN*                                | LPN persistente*   | LPN em remodelação* |
| NT     | 0,63±0,24   |                    |                     |
| OM     | 1,13±0,56   | 10±9 <sup>a</sup>  | 0,59±0,43           |
| GR     | 0,80±0,68   | 7±4 <sup>a</sup>   | 0,87±0,93           |
| BI     | 0,88±0,58   | 2±3 <sup>a</sup>   | 0,86±0,51           |
| GR+BI  | 0,75±0,25   | 23±27 <sup>a</sup> | 0,68±0,44           |

NT = não tratados; OM = óleo de milho (controle); GR = geraniol; BI =  $\beta$ -ionona; GR+BI = geraniol e  $\beta$ -ionona; LPN = lesões pré-neoplásicas; \*média  $\pm$  desvio-padrão.

<sup>a</sup>diferença estatisticamente significativa em relação às respectivas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN ( $p < 0,05$ ), segundo o teste de Wilcoxon.

Os resultados da tabela 4 mostram que o número médio de células positivas para BrdU foi maior ( $p < 0,05$ ) nas LPN persistentes em comparação às respectivas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN nos grupos submetidos ao modelo do RH (OM, GR, BI e GR+BI).

Em comparação ao grupo OM (controle), não houve diferença ( $p > 0,05$ ) quanto ao número de células positivas para BrdU em LPN persistentes entre os grupos GR, BI e GR+BI. Ainda em comparação ao grupo controle, observou-se uma

tendência por parte do grupo BI de apresentar menor número de células positivas para BrdU nas LPN persistentes ( $p < 0,07$ ).

Não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) quanto ao número de células positivas para BrdU em LPN em remodelação entre os grupos GR, BI e GR+BI em comparação ao grupo OM.

Além disso, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) quanto ao número de células positivas para BrdU nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN entre o grupo NT e os demais grupos submetidos ao modelo do RH (OM, GR, BI, GR+BI).

#### **4.5 Concentração plasmática de colesterol total de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”**

A tabela 5 apresenta os resultados referentes às concentrações plasmáticas de colesterol total de ratos NT e tratados com OM, GR, BI e GR+BI.



**Tabela 5.** Concentração plasmática de colesterol total de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

| Grupos | Concentração de colesterol total (mg/dL)* |
|--------|---|
| NT     | 55±5                                      |
| OM     | 76±11 <sup>a</sup>                        |
| GR     | 69,6±10                                   |
| BI     | 68,11±7                                   |
| GR+BI  | 78±11                                     |

NT = não tratados; OM = óleo de milho (controle); GR = geraniol; BI =  $\beta$ -ionona; GR+BI = geraniol e  $\beta$ -ionona; \*média  $\pm$  desvio-padrão.

<sup>a</sup>diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NT (não tratados) ( $p < 0,05$ ), segundo o teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

Como se pode observar na Tabela 5, a concentração plasmática de colesterol total foi maior ( $p < 0,05$ ) entre o grupo OM (controle) em comparação ao grupo NT.

Além disso, em comparação ao grupo OM (controle), os grupos GR, BI e GR+BI não apresentaram diferenças nas concentrações plasmáticas de colesterol total. Apesar da diferença não ser estatisticamente significativa, houve uma tendência por parte do grupo BI de apresentar um menor valor ( $p < 0,07$ ) de concentração plasmática de colesterol total quando comparado ao grupo controle.

#### 4.6 Quantificação de corpúsculos apoptóticos presentes dentro e fora das lesões marcadas positivamente para a enzima GST-P nos fígados de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”

A Tabela 6 apresenta os resultados referentes à quantificação de CAs em LPN persistentes, em remodelação e nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN.

**Tabela 6.** Quantificação de corpúsculos apoptóticos em LPN persistentes, em remodelação e nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN de ratos Wistar NT ou tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

| Grupos | Número de CA/mm <sup>2</sup> |                           |                           |
|--------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|        | Área ao redor das LPN*       | LPN persistente*          | LPN em remodelação*       |
| NT     | 0,08±0,02                    |                           |                           |
| OM     | 0,11±0,04                    | 2,5±1,7 <sup>b</sup>      | 0,42±0,44 <sup>b</sup>    |
| GR     | 0,10±0,05                    | 22,9±36,3 <sup>a, b</sup> | 2,78±2,88 <sup>a, b</sup> |
| BI     | 0,10±0,04                    | 4,9±7,3 <sup>b</sup>      | 2,70±3,89 <sup>b</sup>    |
| GR+BI  | 0,10±0,02                    | 9,9±17,9 <sup>b</sup>     | 0,87±0,66 <sup>b</sup>    |

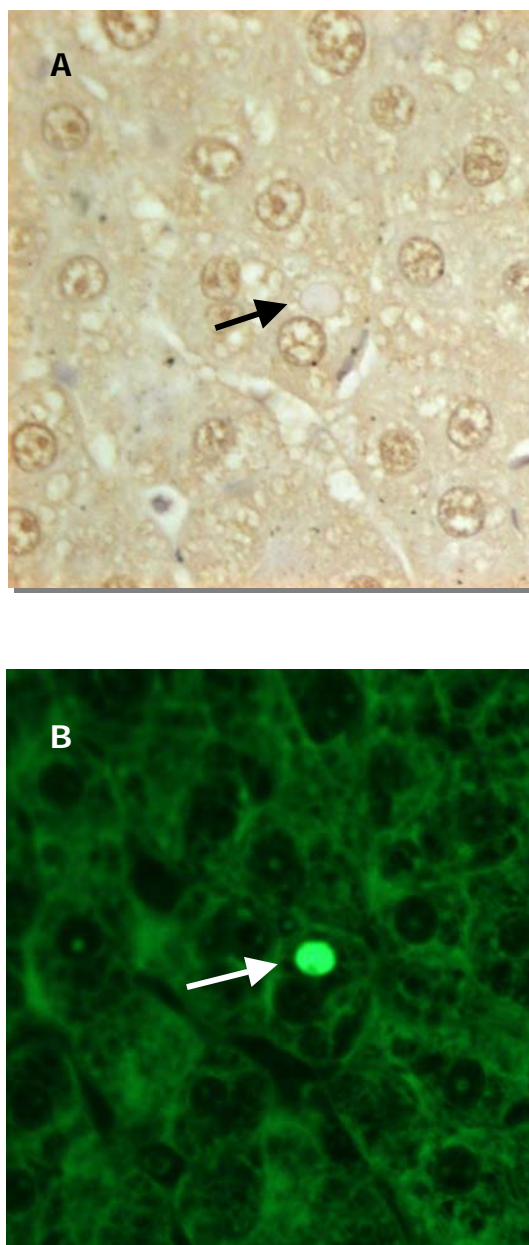
NT = não tratados; OM = óleo de milho (controle); GR = geraniol; BI =  $\beta$ -ionona; GR+BI = geraniol e  $\beta$ -ionona; LPN = lesões pré-neoplásicas; \*média  $\pm$  desvio-padrão.

<sup>a</sup>diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo OM (controle) ( $p < 0,05$ ), segundo o teste de Kruskal-Wallis.

<sup>b</sup>diferença estatisticamente significativa em relação às respectivas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN ( $p < 0,05$ ), segundo o teste de Wilcoxon.

Observou-se um maior ( $p < 0,05$ ) número de CAs em LPN persistentes e em remodelação no grupo GR quando comparado ao grupo OM (controle). Ainda em comparação ao grupo OM, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos BI e GR+BI quanto ao número de CA presentes nas LPN persistentes e em remodelação.

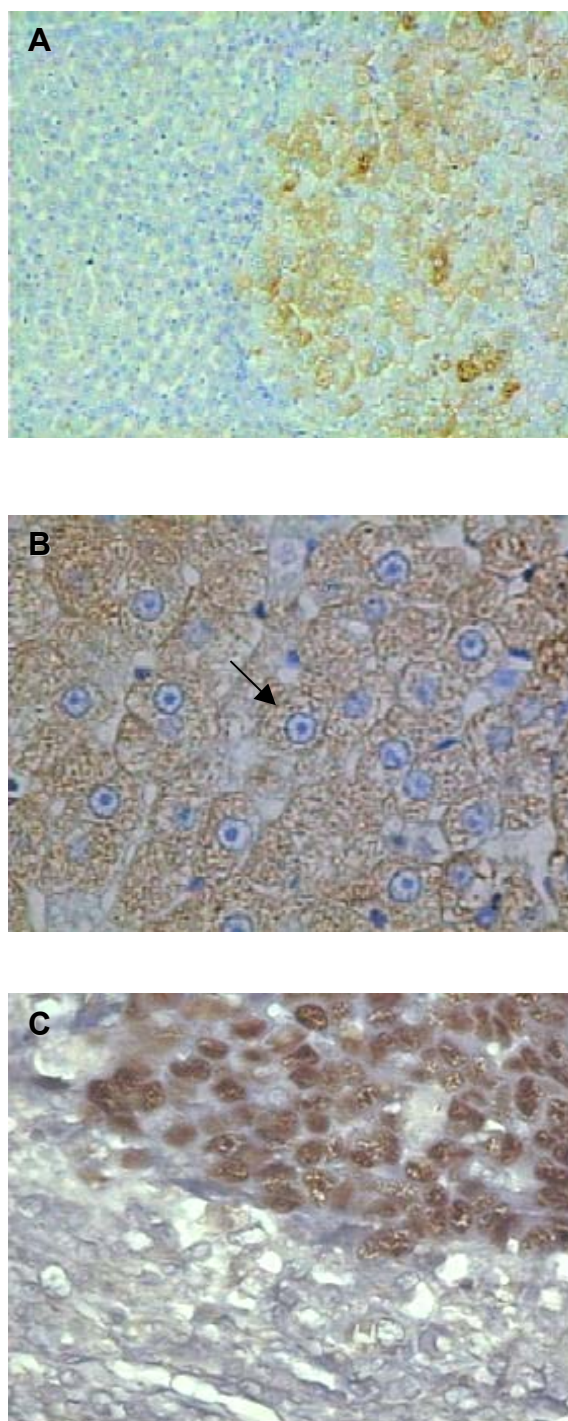
Observa-se ainda na Tabela 6, que nos grupos submetidos ao modelo do RH (OM, GR, BI e GR+BI) o número de CAs nas LPN persistentes e em remodelação foi maior ( $p < 0,05$ ) do que nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) quanto ao número de CAs entre o grupo NT e as áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN dos grupos OM, GR, BI e GR+BI.



**Figura 12.** Cortes histológicos hepáticos de rato Wistar corado com hematoxilia e eosina (A) e submetidos à fluorescência (B), indicando a presença de um corpúsculo apoptótico. Objetiva: 40X.

#### **4.7 Quantificação de LPN marcadas positivamente para a proteína p53 nos cortes histológicos dos fígados de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”**

Como se observa na Figura 13, a marcação imunoistoquímica para a proteína p53 foi observada somente nas LPN hepáticas e, portanto, esteve raramente presente nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN e no grupo NT. Além disso, observou-se marcação citoplasmática para esta proteína nos grupos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese. Diferentemente, foi observada no controle positivo da técnica, marcação nuclear para esta proteína.



**Figura 13.** Fotomicrografias de corte histológico de fígado submetido ao modelo do RH. **A.** LPN marcada positivamente para p53. Objetiva de 20X. **B.** A seta indica imunomarcagem citoplasmática de p53 em hepatócitos de uma LPN persistente. Objetiva de 40X. **C.** Controle positivo para marcação imunoistoquímica para p53. Carcinoma de células escamosas (DakoCytomation, Carpinteria), no qual se observa marcação nuclear para a proteína p53. Objetiva de 40X.

A Tabela 7 apresenta os resultados referentes à marcação imunoistoquímica de LPN hepáticas persistentes ou em remodelação positivas para a proteína p53.

**Tabela 7.** Porcentagem de LPN hepáticas persistentes ou em remodelação com marcação imunoistoquímica citoplasmática para p53 de ratos Wistar tratados com OM, GR, BI ou GR+BI, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”.

| Percentual de LPN positivas para p53 no citoplasma celular |                    |                       |
|--|--------------------|-----------------------|
| Grupos   | LPN persistentes*  | LPN em remodelação*   |
| OM   | 70±22              | 24±9 <sup>a</sup>     |
| GR   | 79±12 <sup>b</sup> | 24±13 <sup>a</sup>    |
| BI   | 69±14              | 20±16 <sup>a, b</sup> |
| GR+BI  | 60±26              | 18±8 <sup>a, b</sup>  |

OM = óleo de milho (controle); GR = geraniol; BI =  $\beta$ -ionona; GR+BI = geraniol e  $\beta$ -ionona  
 LPN = lesões pré-neoplásicas; \*média  $\pm$  desvio-padrão.

<sup>a</sup>diferença estatisticamente significativa em relação às respectivas LPN persistentes ( $p < 0,05$ ), segundo o teste de Wilcoxon.

<sup>b</sup>diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo OM (controle) ( $p < 0,05$ ), segundo o teste Qui-Quadrado.

Como pode ser observado na Tabela 7, todos os grupos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese apresentaram uma maior ( $p < 0,05$ ) porcentagem de LPNs persistentes marcadas positivamente para p53 no citoplasma, ao passo que as LPNs em remodelação respondem pela maior parte das não marcadas para p53.

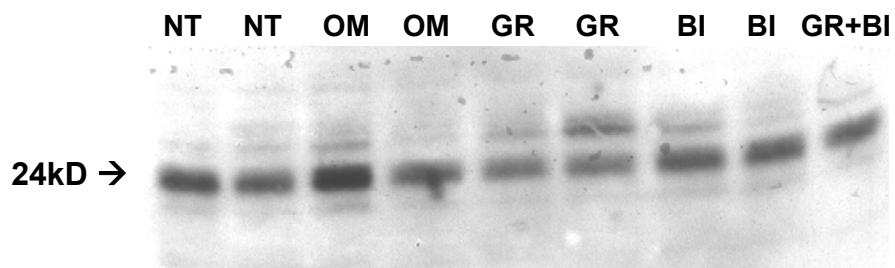
O grupo GR apresentou uma maior ( $p < 0,05$ ) porcentagem de LPN persistentes com marcação citoplasmática para p53 quando comparado ao grupo OM (controle). Não houve diferença na porcentagem de LPN persistentes positivas para p53 citoplasmático entre os grupos BI e GR+BI quando comparados ao grupo OM.

Ainda em comparação ao grupo OM, os grupos BI e GR+BI apresentaram uma menor ( $p < 0,05$ ) porcentagem de LPN em remodelação com marcação citoplasmática para p53. Não houve diferença entre a porcentagem de LPN em remodelação positivas para p53 citoplasmático no grupo BI quando comparado ao grupo OM.

#### **4.8 Avaliação da proteína RhoA na membrana celular hepática de animais tratados com geraniol ou $\beta$ -ionona, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”**

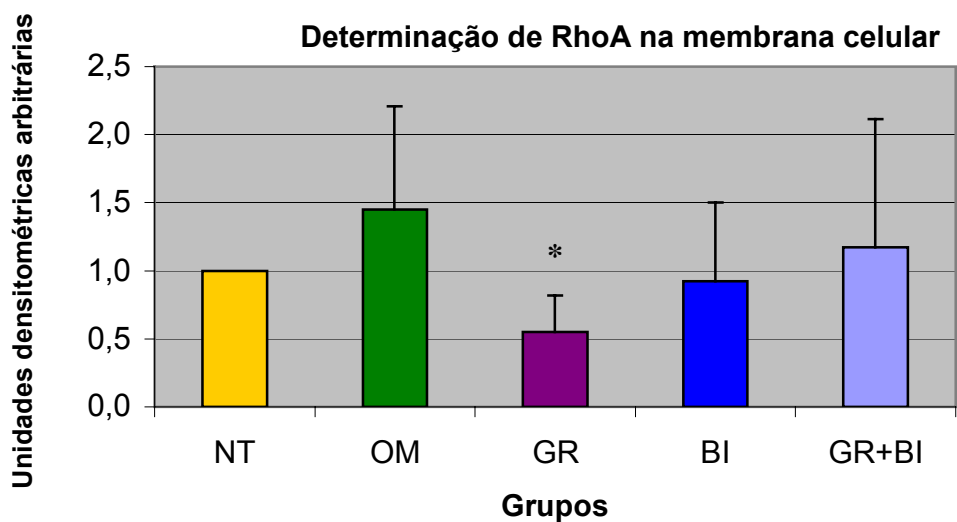
A avaliação da proteína RhoA foi realizada por meio da técnica de “western blotting”, utilizando extratos de proteína de membrana (Figura 14). A leitura da intensidade das bandas foi efetuada por meio de densitometria. Os valores assim obtidos foram expressos em unidades densitométricas arbitrárias, e os resultados podem ser graficamente visualizados na Figura 15.





NT = não tratados (n=4); OM = óleo de milho (controle) (n=4); GR = geraniol (n=4); BI =  $\beta$ -ionona (n=4); GR+BI = geraniol e  $\beta$ -ionona (n=4).

**Figura 14.** Quimioluminescência obtida por meio da técnica “western blot”, capturada em filme de Raio-X, mostrando a banda correspondente à proteína RhoA presente na membrana celular de tecido hepático.



NT = não tratados; OM = óleo de milho (controle); GR = geraniol; BI =  $\beta$ -ionona; GR+BI = geraniol e  $\beta$ -ionona

\*diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo OM (controle) ( $p < 0,05$ ), segundo o teste ANOVA seguido do teste de Tukey.

**Figura 15.** Normalização dos valores obtidos por meio do “western blotting” da proteína RhoA. Os valores (média  $\pm$  desvio padrão) estão expressos em unidades densitométricas arbitrarias dos grupos submetidos ao modelo do “RH” em relação ao grupo NT, considerado como 1.

O grupo GR apresentou menor ( $p < 0,05$ ) expressão de RhoA na membrana celular hepática em comparação ao grupo OM (controle). Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) na expressão de RhoA na membrana celular hepática entre os grupos BI e GR+BI quando comparados ao grupo OM.

## 5. DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos indicam a existência de uma associação inversa entre a frequência da ingestão de alimentos de origem vegetal e a incidência de neoplasias malignas (WOLLET, 1994). Além disso, sabe-se que diversas classes de CBAs são capazes de desencadear respostas biológicas que reduzem o risco de desenvolvimento de neoplasias benignas e malignas (KONG et al., 2001); contudo, seus mecanismos de ação são pouco compreendidos (AGGARWALL, SHISHODIA, 2006). A investigação desses mecanismos contribui não somente para a elucidação de aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, como também pode ter um grande impacto em estratégias de quimioprevenção (AMES et al., 1995; DE FLORA et al., 2001).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial quimiopreventivo do GR e da BI, isoprenóides presentes na erva cidreira, limão e vinho tinto, quando administrados a ratos Wistar, isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” (RH). Além disso, a fim de caracterizar os possíveis mecanismos de ação quimiopreventiva dos isoprenóides GR e BI, foram avaliados ainda neste estudo seus efeitos na proliferação celular, apoptose e na modulação das proteínas RhoA e p53.

Assim, o presente estudo mostrou que, à macroscopia, o tratamento com BI diminuiu o número de nódulos em comparação ao grupo controle. Além disso, por meio da análise morfométrica das LPN GST-P positivas, observou-se um menor número de LPN persistentes, bem como menor percentual da área do corte

histológico hepático ocupado por estas LPN, consideradas precursoras dos hepatocarcinomas (FARBER et al., 1988).

Esses dados indicam, portanto, que a BI apresenta um efeito inibitório no desenvolvimento de LPN, quando administrada na dose 16 mg/100 g p.c., durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese no modelo do RH.

Diversos estudos *in vitro* observaram atividade antitumoral por parte da BI, com diferentes tipos celulares. No entanto, poucos estudos na literatura avaliaram a atividade quimiopreventiva da BI *in vivo*.

Estudos com a BI evidenciaram sua atividade antitumoral em cultura de células MCF-7 de câncer de mama de forma dose-dependente (LIU et al., 2004; DUNCAN et al., 2004), em populações de células B16 de melanoma (HE et al., 1997; MO, ÉLSON, 1999), células HL-60 de leucemia pró-mielocítica aguda, células Caco-2 de adenocarcinoma de cólon (MO, ÉLSON, 1999) e células SGC-7901 de adenocarcinoma pancreático (LIU et al., 2004a; LIU et al., 2004b). Além disso, He et al. (1997) observaram um aumento de sobrevivência de camundongos que receberam BI na ração (2mmol/kg), após o transplante com células B16 de melanoma.

A atividade quimiopreventiva dessa substância também foi observada *in vivo* por nosso grupo (ESPÍNDOLA et al. 2005). Nesse estudo, a BI foi administrada nas doses de 8 e 16 mg/100 g p.c., sendo que ambas foram capazes de diminuir a incidência e o número de nódulos hepáticos, bem como o número e o tamanho de LPN persistentes. Estas observações foram realizadas no modelo de hepatocarcinogênese do RH, porém, administrando-se a BI durante as etapas de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese. Nesse trabalho, os autores sugerem uma eventual atuação da substância no processo de destoxificação do agente carcinogênico iniciante DEN.

De forma geral, os compostos que atuam na fase de iniciação da carcinogênese – considerados agentes bloqueadores – evitam a ocorrência de mutações no DNA, inibindo a ativação de carcinogênicos e induzindo sua destoxificação por meio da modulação de enzimas de fase I e II, respectivamente; induzindo o sistema de reparo do DNA e seqüestrando espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, os compostos que atuam nas fases de promoção e progressão – considerados agentes supressores – inibem a proliferação das células iniciadas e/ou induzem a apoptose, eliminando, dessa forma, células com danos no genoma (WATTENBERG, 1996; MANSON et al., 2000; KAKIZOE et al., 2003).

Dessa forma, os resultados do presente estudo revelam que a BI é um composto quimiopreventivo com atividade supressora da carcinogênese, capaz de atuar na fase de promoção da hepatocarcinogênese, reforçando seu potencial como um quimiopreventivo hepático.

Os tratamentos com GR e GR+BI, resultaram em um menor número de LPN GST-P positivas persistentes, indicando um efeito inibitório no desenvolvimento de LPN, quando administrados nas doses 25 mg/100g p.c. de GR e 25 mg/100g p.c. de GR + 16 mg/100g p.c. de BI, durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese no modelo do RH.

Diversos estudos *in vitro* demonstraram a atividade anticarcinogênica do GR. No entanto, poucos estudos da literatura estudaram a ação desses isoprenóides *in vivo* ou quando associados.

Yu et al. (1995) observaram a atividade quimiopreventiva do GR no modelo de carcinogênese de mama induzida pelo 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) em ratas Sprague-Dawley. Este monoterpene foi administrado na ração (36 mmol/100 g de ração) durante 2 semanas antes da aplicação de DMBA e 22

semanas após, resultando em redução da multiplicidade de tumores de mama. Também foi observada uma ação supressora tumoral do GR em ratos transplantados com hepatomas de Morris 7777, os quais receberam 23 mmol GR/100 g de ração, e camundongos transplantados com melanomas B16 que receberam 0,65; 6,5 e 65 mmol GR/100g ração, sendo que esse último apresentou ação de forma dose-dependente (YU, HILDEBRANDT, ELSON, 1995). Já em 1997, Burke et al. observaram a ação antitumoral do GR quando fornecido a hamsters ração contendo 2 g/100 g de GR antes e após do transplante de células de adenocarcinoma pancreático PC-1.

Como já mencionado, a erva cidreira é uma importante fonte natural de GR (RAO et al., 2002). Dessa forma, em estudo com ratos que receberam o extrato de erva cidreira na ração (0,2%; 0,6%; 1,8%) 1 semana após a iniciação com DEN, durante 10 semanas, verificou-se que todas as concentrações oferecidas foram capazes de inibir o número, mas não o tamanho das LPN GST-P positivas hepáticas (PUATANACHOKCHAI et al., 2002).

De forma semelhante ao observado no presente trabalho, estudo anterior realizado pelo nosso grupo demonstrou a atividade quimiopreventiva do GR quando administrado continuamente durante as fases de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese no modelo do RH, por meio da diminuição do tamanho das LPN GST-P positivas persistentes (ONG et al., 2006). Nesse estudo foi administrada a mesma dose de GR (25mg/100g p.c.); porém, sua administração iniciou-se previamente à aplicação do modelo de hepatocarcinogênese.

Diante dos vários trabalhos já citados demonstrando a ação antitumoral de isoprenóides, alguns autores investigaram seus possíveis efeitos quando administrados em associação. He et al. (1997) avaliaram a ação da BI, um

isoprenóide cíclico, associada ao gama-tocotrienol, um isoprenóide misto. Estas substâncias foram administradas nas doses de 2 mmol/kg de ração a camundongos após transplante com células B16 de melanoma e resultaram na supressão do crescimento tumoral, evidenciando um efeito antitumoral aditivo e potencialmente sinérgico desses isoprenóides quando associados. Em cultura de células, a associação entre esses dois isoprenóides - o gama-tocotrienol e a BI - demonstrou uma possível ação sinérgica dessas substâncias (MO, ÉLSON 1999; HE et al., 1997).

Entretanto, a associação entre BI e carvacrol, dois isoprenóides cíclicos, quando administrados à cultura de células B16 de melanoma, demonstrou uma atividade supressora do crescimento inferior à esperada (HE et al., 1997). Já Mo e Élson (1999) verificaram a possibilidade de uma ação sinérgica entre 2 isoprenóides acíclicos (um análogo do farnesol e um análogo do geraniol), em cultura de células de melanoma B16, obtendo um resultado também inferior ao esperado.

Assim, estes autores sugeriram que uma associação entre isoprenóides somente cíclicos ou acíclicos não resulta em ação sinérgica, uma vez que, possivelmente, o membro menos potente da associação poderia estar atenuando a ação de supressão tumoral do membro mais potente (MO; ÉLSON, 1999; HE et al., 1997).

Nesse contexto, é importante destacar que não existem, até o momento, dados disponíveis na literatura em que se demonstrou *in vivo* a associação dos isoprenóides GR (acíclico) e BI (cíclico) na carcinogênese, bem como a atuação destes durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese. Assim, os dados do presente estudo, que demonstram a atividade quimiopreventiva dos isoprenóides GR



e BI quando administrados em associação a ratos durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese parecem ser inéditos.

Dessa forma, os resultados do presente estudo demonstram que o GR e a associação GR+BI são compostos quimiopreventivos com atividade supressora da carcinogênese, capazes de atuar na fase de promoção da hepatocarcinogênese. Entretanto, o GR e a BI não demonstram uma atividade sinérgica ou aditiva quando administrados em associação.

No presente estudo, os resultados da análise morfométrica das LPN GST-P positivas mostraram, ainda, que os tratamentos com GR, BI e GR+BI aumentaram o percentual de LPN em remodelação. Esta observação sugere que estes compostos induzem o fenômeno da remodelação, que se caracteriza pelo desaparecimento progressivo de marcadores moleculares de LPN, incluindo a GST-P, seguido pelo desaparecimento de evidências histológicas dessas LPN (FEO et al., 2005).

Acredita-se que este fenômeno possa envolver a rediferenciação dos hepatócitos das LPN para um fenótipo semelhante ao do tecido normal, com a possibilidade da ocorrência de uma reposição progressiva de hepatócitos a partir das áreas ao redor das LPN sem alterações morfológicas. Assim, o bloqueio dessa rediferenciação poderia caracterizar a persistência de LPN (FARBER, 1980).

No mesmo sentido, outros autores caracterizaram a remodelação como um processo em que a célula volta a expressar características mais próximas da “normalidade” (TATEMATSU; NAGAMINE; FARBER, 1983; RIZZI et al., 1997; FONSECA et al., 2005).

Recentemente, estudos demonstraram que a remodelação é um processo sob controle genético, regulado por diversos genes que controlam o número e volume de LPN em remodelação (DE MIGLIO et al., 2003; FEO et al., 2005), cuja

atividade poderia estar sendo, eventualmente, modulada pelos isoprenóides GR e BI.

Em trabalho anterior de nosso grupo, foi observado um maior número de LPN em remodelação após o tratamento de ratos Wistar com  $\beta$ -caroteno e vitamina A, durante o período de promoção da hepatocarcinogênese no modelo do RH (RIZZI et al., 1997).

Contudo, o mecanismo molecular da persistência e/ou da remodelação na hepatocarcinogênese não é bem conhecido (FEO et al., 2006). Entretanto, considera-se a proliferação celular e a apoptose eventos críticos na progressão da neoplasia, bem como em sua remodelação (KANUNFRE et al., 2004), uma vez que nódulos persistentes parecem bloquear a diferenciação celular ou a apoptose, podendo evoluir para um carcinoma hepatocelular (DE MIGLIO et al., 2003).

As principais características do desenvolvimento do câncer, bem como de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas, são alterações nos níveis de proliferação celular e de apoptose no tecido alvo (SHULTE-HERMANN et al., 1993). Dessa forma, estes mecanismos são alvos importantes de atuação de agentes quimiopreventivos (MORI et al., 2001). Nesse contexto, com o objetivo de verificar se as atividades quimiopreventivas observadas para o GR e a BI, quando administrados isoladamente ou em associação, durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese, estariam eventualmente relacionadas a uma inibição da proliferação celular, avaliou-se o número de hepatócitos marcados positivamente com a BrdU nas amostras de fígado dos animais NT e tratados com OM, GR, BI e GR+BI.

Foi possível observar que, em todos os grupos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH, o número de células marcadas positivamente para

BrdU foi maior nas LPN persistentes do que nas respectivas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN. Assim, estes dados estão de acordo com a literatura, que descreve um aumento gradativo da proliferação celular durante a hepatocarcinogênese, conforme esta evolui de tecidos normais a LPN, seguidas de adenomas e carcinomas (FARBER, SARMA, 1987; KONG, RINGER, 1996; SAFTOIU et al., 2003).

Os tratamentos com GR e BI, isoladamente ou em associação, não resultaram em modificações nos níveis de proliferação celular em LPN ou nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN. Entretanto, foi observada uma tendência de inibição da proliferação celular em LPN persistentes por parte do tratamento com BI, sugerindo que, eventualmente, a BI possa ter sua atividade quimiopreventiva relacionada à inibição da proliferação celular em LPN persistentes.

Observou-se em trabalhos prévios do nosso grupo que as administrações dos isoprenóides geranilgeraniol e BI continuamente, durante as etapas de iniciação e promoção do modelo do RH, resultaram em inibições da proliferação celular nas LPN e nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das mesmas (ESPÍNDOLA et al., 2005). Já o tratamento com GR durante as etapas de iniciação e promoção do modelo do RH, resultou na inibição da proliferação celular nas LPN (ONG et al., 2006).

Descreve-se que *in vitro* tanto o GR como a BI inibem a proliferação de diversas linhagens de células tumorais (HE et al., 1997; CARNESECCHI et al., 2002; LIU et al., 2004a; DUNCAN et al., 2004; LIU et al., 2004b).

Nesse sentido, Duncan et al. (2004) e Liu et al. (2004b), observaram redução na proliferação de células MCF-7 de tumores de mama e células SGC-7901 de adenocarcinoma gástrico, respectivamente, após tratamento com BI. Além disso, He

et al. (1997) observaram em diversos isoprenóides, entre eles a BI, seus potenciais de inibição da proliferação de células da linhagem B16 de melanoma murínico.

No caso do GR, verificou-se inibição da proliferação de células MCF-7 de tumores de mama (DUNCAN et al., 2004), células Caco-2 de adenocarcinomas de cólon (CARNESECCHI et al., 2002), células P388 de leucemia (SHOFF et al., 1991) e B16 de melanoma murínico (YU et al., 1995).

Além disso, alguns estudos identificaram proteínas que foram moduladas pela administração de isoprenóides e que desempenham papel importante na maquinaria do ciclo celular, como ciclinas D1, E, A, CDK-2 e CDK-4 (MO, ELSON, 1999; CARNESECCHI et al., 2002; DUNCAN et al., 2004).

Sabe-se que a proliferação celular requer pelo menos dois produtos sintetizados pela via do mevalonato: o colesterol e produtos não-esteróis, como isoprenóides, envolvidos com modificações pós-tradução (farnesilação e geranilgeranilização) de proteínas relacionadas à sobrevivência das células (GOLDSTEIN; BROWN, 1990; MO, 2002). Dessa forma, os efeitos antiproliferativos de isoprenóides têm sido relacionados à inibição da enzima HMG-CoA redutase, a enzima chave da biosíntese do mevalonato (CLARK, 1992). Nesse sentido, observa-se uma correlação entre as taxas de crescimento e proliferação celular e as taxas de síntese de colesterol (SIPERSTEIN, 1984).

Descreve-se que monoterpenos, como o GR (FITCH, et al., 1989; PEFFLEY; GAYEN, 2003; DUNCAN et al., 2004), e outros isoprenóides como a BI (ESPÍNDOLA et al., 2005; DUNCAN et al., 2004) são capazes de suprimir a síntese de HMG CoA-redutase em nível pós-transcricional, destacando-se a atuação desses compostos na degradação da enzima (PARKER et al., 1993; ELSON et al., 1999). Nesse contexto, grande importância tem sido atribuída à inibição da HMG-CoA

redutase, com consequente modulação das concentrações plasmáticas de colesterol total e inibição da proliferação celular, como um dos mecanismos de ação supressora da carcinogênese por isoprenóides (ELSON, 1995; 1999).

No presente estudo, não foram observadas alterações nas concentrações plasmáticas de colesterol total entre os os grupos tratados com OM, GR, BI ou GR+BI. Entretanto, o tratamento com BI indica uma eventual diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol total em relação ao grupo controle.

Trabalhos anteriores realizados por nosso grupo demonstraram que a administração do GR (25mg/100g rato) durante 8 semanas consecutivas em período compreendendo a iniciação e a promoção da hepatocarcinogênese, não modificou as concentrações plasmáticas de colesterol total (ONG et al., 2006). Já a administração de BI na dose de 16mg/100g rato, também durante a iniciação e a promoção da hepatocarcinogênese, diminuiu as concentrações plasmáticas de colesterol total e suprimiu a proliferação celular (ESPÍNDOLA et al., 2005).

Dessa forma, sugere-se que a atividade quimiopreventiva da BI durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese pode, eventualmente, envolver a diminuição da concentração plasmática de colesterol total e uma possível inibição da proliferação celular.

Por outro lado, no caso do GR, o fato de não se ter observado reduções nas concentrações plasmáticas de colesterol total em ratos tratados com o monoterpeno, sugere que este não tenha inibido a atividade da HMGCoA redutase. Dessa forma, a ausência de inibição da proliferação celular pelo GR observado no presente estudo pode estar relacionada à incapacidade deste composto em modular a atividade da HMGCoA redutase.

Os resultados da avaliação da apoptose no tecido hepático demonstraram que nos grupos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH, o número de CAs nas LPN foi maior do que nas respectivas áreas sem alterações morfológicas ao redor das mesmas.

Assim, de forma semelhante ao que ocorre com a proliferação celular, observa-se que à medida que o processo da hepatocarcinogênese evolui, também se observa um aumento no número de células que entram em apoptose, mais especificamente no interior das LPN hepáticas (COLLINS et al., 1997; SCHULTE-HERMANN et al., 1998).

Além disso, o tratamento com GR, mas não com BI ou GR+BI, durante o período de promoção da hepatocarcinogênese, aumentou o número de CAs em LPN persistentes e em remodelação. O mesmo efeito não foi constatado nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN.

Poucos estudos *in vitro* estudaram a capacidade de modulação da apoptose pelos isoprenóides GR e BI. Duncan et al. (2004) não observaram atividade pro-apoptótica por parte do GR e da BI em células MCF-7 de carcinoma de mama. Por outro lado, o GR foi capaz de induzir a apoptose em células de carcinoma de pâncreas (BURKE et al., 2002) e a BI em células SGC-7901 de adenocarcinoma gástrico (LIU et al., 2004a), células B16 de melanoma e HL-60 de leucemia (MO, ÉLSON, 1999). Convém ressaltar que não foram encontrados na literatura estudos avaliando a modulação da morte celular pela associação dos isoprenóides GR e BI.

De forma semelhante ao presente estudo, em trabalho prévio de nosso grupo constatou-se uma indução da apoptose em LPN quando o GR foi administrado continuamente durante as fases de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese no modelo do RH (ONG et al., 2006). Foi observado também por nosso grupo que a

atividade quimiopreventiva da BI quando administrada durante as etapas de iniciação e promoção do modelo do RH, não parece ter envolvido indução da apoptose (ESPÍNDOLA et al., 2005).

Dessa forma, é possível concluir no presente estudo que as atividades quimiopreventivas do GR, mas não da BI e da associação GR+BI, durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese parecem envolver a indução da apoptose em LPN. Além disso, sugere-se que a administração de GR em associação a BI, resulta em um eventual antagonismo desses compostos e conseqüente atenuação da atividade pró-apoptótica do GR.

A inativação do gene supressor de tumor p53 representa um dos eventos moleculares mais freqüentes na neoplasia humana e animal (PRIVES; HALL, 1999), uma vez que esta proteína atua efetivamente em ambos os processos de proliferação celular e apoptose (KASTAN et al., 1991; STANLEY, 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 se refere à sequestração da proteína ao nível citoplasmático (MOLL et al., 1995). Relata-se que a p53 pode ser exportada do núcleo por uma proteína chamada Mdm2. Além dessa, várias proteínas têm sido relacionadas ao ancoramento citoplasmático de p53, incluindo proteínas ribossomais, 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).

Van Gijssel et al. (2000) realizaram um estudo com ratos Wistar submetidos ao modelo do RH para avaliar a resposta celular a um dano genotóxico provocado por irradiação. Nesse estudo, a exposição à irradiação levou à indução de p53

nuclear nos hepatócitos em áreas sem alterações morfológicas ao redor de LPN. Além disso, a marcação imunoistoquímica para a proteína p53 nuclear esteve diminuída após duas semanas do tratamento com o carcinógeno 2-AAF. Nos demais animais, que foram sujeitos apenas aos procedimentos inerentes ao modelo do RH, ou seja, sem a submissão à irradiação, houve acúmulo da p53 citoplasmática nas LPN ao final da 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas da iniciação. Dessa forma, os autores concluíram que a via de p53 em resposta a um estress genotóxico está prejudicada em LPN, podendo favorecer a expansão clonal e transformação maligna.

Outros trabalhos de carcinogênese sugerem que o acúmulo de p53 na fração citoplasmática da célula constitui um indicativo de estado patológico (MOLL et al., 2005).

Em trabalho realizado por nosso grupo com o modelo do RH também se observou um acúmulo de p53 na fração citoplasmática dos hepatócitos de LPN, sobretudo naquelas consideradas persistentes, sugerindo que características peculiares da persistência dessas lesões possam estar envolvidas, em parte, com a perda da função de p53 que acompanha seu acúmulo no citoplasma (MAZZANTINI et al., 2007).

Assim, os resultados referentes à proteína p53 no presente estudo estão de acordo com a literatura, já que na ausência de danos no DNA hepático provocados em momentos próximos à eutanásia dos animais, não foram observadas marcações nucleares. Além disso, de acordo com as observações de Van Gijssel et al. (2000) e Mazzantini et al. (2007), as marcações citoplasmáticas da p53 estavam presentes apenas nas LPN.

Foi observado, ainda, que a marcação imunoistoquímica de p53 citoplasmática foi rara nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN,



porém, presente em LPN em remodelação e presente em uma maior porcentagem de LPN persistentes, o que pode representar uma falha na resposta de proteção ao genoma.

Além disso, foi observado que, em comparação ao grupo controle, os grupos tratados com BI e GR+BI, apresentaram uma menor porcentagem de LPN em remodelação positivas para p53. Assim, sugere-se que LPN em remodelação positivas para p53 parecem ser mais sensíveis às atividades quimiopreventivas da BI, quando administrada isoladamente ou em associação ao GR, durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese no modelo do RH.

Com relação aos animais tratados com GR, foi observada uma maior porcentagem de LPN persistentes marcadas positivamente para p53, quando comparados aos animais do grupo controle. Dessa forma, a atividade quimiopreventiva observada por parte do GR ocorreu, talvez, preferencialmente em LPN persistentes com marcação imunohistoquímica negativa para p53, sugerindo uma atuação dessa substância nas LPN persistentes com características menos agressivas.

Ressalta-se a inexistência de trabalhos *in vivo* na literatura avaliando a modulação de p53 por isoprenóides. Entretanto, conforme estudos *in vitro*, descreve-se na literatura que a indução da apoptose por isoprenóides ocorre de forma independente da função da proteína p53 (MO; ELSON, 1999).

Em trabalho prévio realizado por nosso grupo, o tratamento de ratos Wistar com BI (16 mg/100g p.c) durante as etapas de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese no modelo do RH, resultou em uma menor porcentagem de LPN em remodelação positivas para p53 (Roseli et al. dados ainda não publicados).

Outro trabalho de nosso grupo demonstrou que a atividade quimiopreventiva da tributirina, quando administrada durante as fases de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese, esteve relacionada a uma menor porcentagem de LPN persistentes positivas para p53 (KUROIWA, 2007).

Nesse contexto, sugere-se que a proteína p53 pode, eventualmente, ser um importante alvo de CBAs com propriedades quimiopreventivas na hepatocarcinogênese.

A presença da proteína RhoA nas membranas celulares foi avaliada, uma vez que diversos estudos revelaram uma correlação entre o aumento dos níveis da proteína RhoA e o aumento da malignidade em tumores (MO; ELSON, 2004). Alterações nos níveis dessa proteína foram observadas no hepatocarcinoma, tanto em animais como em humanos (DURKIN, et al. 2002; BENITAH et al. 2004; LI et al. 2006).

A proteína RhoA faz parte da família de proteínas Rho GTPases, e apresenta um papel importante na regulação de vários processos celulares como a apoptose, diferenciação e a proliferação celular (SCITA et al., 2000; DANESH et al., 2002; TOKSOZ; MERDEK, 2002).

A ativação de RhoA envolve uma modificação pós-tradução, que consiste na incorporação covalente de isoprenóides à proteína (processo denominado isoprenilação) (MARSHALL, 1993, EDWARDS; ERICSSON, 1999). A isoprenilação envolve a adição dos isoprenóides farnesol (15 carbonos) ou, mais comumente, de geranylgeraniol (20 carbonos) a resíduos de cisteína no carbono terminal ou próximo a este. Esta modificação é requerida como um mediador da associação da proteína à membrana celular (HANCOCK et al., 1989; MARSHALL, 1993; HENNEKES; NIGG, 1994; CASEY; SEABRA, 1996).

Dessa forma, uma eventual inibição da isoprenilação da proteína RhoA, pode ocasionar sua incorreta localização intracelular e, conseqüentemente, as vias de sinalização correspondentes serão desreguladas (GNAD; KAINA; FRITZ, 2001).

Nesse sentido, foram avaliados no presente estudo os níveis de RhoA ligados às membranas celulares hepáticas de animais tratados ou não com GR, BI e GR+BI, durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese no modelo do RH.

Observou-se após o tratamento com OM, maiores níveis de RhoA nas membranas celulares quando comparado ao grupo NT, sugerindo que o modelo de hepatocarcinogênese do RH aumenta os níveis dessa proteína, e, eventualmente, sua atividade celular, de forma semelhante ao que se relata na carcinogênese hepática em humanos (LI et al. 2006).

Além disso, o tratamento com GR, mas não com BI ou GR+BI, diminuiu os níveis de RhoA nas membranas celulares hepática. Assim, sugere-se que a atividade quimiopreventiva do GR observada no presente estudo, pode envolver uma menor ativação de RhoA.

São escassos os relatos na literatura demonstrando *in vivo* a modulação de RhoA por derivados isoprênicos.

Segundo Mo e Élson (2004), monoterpenos cíclicos bloqueiam a isoprenilação de RhoA, por meio da inibição de enzimas relacionadas à isoprenilação, ou suprimindo a síntese do mevalonato.

Duncan et al. (2004), observaram uma inibição do crescimento de células MCF-7 de câncer de mama após o tratamento com GR e BI, e sugeriram que uma possível inibição da isoprenilação de proteínas por parte dessas substâncias, pode ser um mecanismo alternativo para explicar a inibição da proliferação celular. No entanto, não foram avaliadas as atividades dessa proteína no estudo em questão.

Outro estudo *in vitro* demonstrou que, a adição de um monoterpene, o álcool perilílico, à cultura de células de leucemia mielocítica crônica, resultou em menor ativação, de forma dose-dependente, das proteínas Ras e RhoA (HOLSTEIN; HOHL, 2003).

Nesse sentido, sugere-se que diversos mecanismos podem estar envolvidos com os menores níveis de RhoA observados no grupo tratado com GR, como, eventualmente, a inibição da isoprenilação dessa proteína.

## 6. CONCLUSÕES

- A administração de BI durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH, resultou em atividade quimiopreventiva considerada pronunciada. Nessas mesmas condições, a administração de GR e da associação GR+BI resultou em atividade quimiopreventiva considerada moderada.
- A atividade quimiopreventiva por parte da BI, se deveu, em parte, à um menor número de nódulos visíveis macroscopicamente, inibição de LPN persistentes, à sua tendência de inibir a proliferação celular e modulação de p53.
- A atividade quimiopreventiva do GR, parece estar relacionada à sua capacidade de inibir LPN persistente, induzir a apoptose em LPN e diminuir os níveis da proteína RhoA nas membranas celulares hepática.
- A atividade quimiopreventiva da associação GR+BI, se deveu, em parte, à inibição de LPN persistentes e modulação de p53; no entanto, a associação desses compostos não resultou em atividade aditiva ou sinérgica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of câncer. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.1397-1421, 2006.
- AELST, L. V. SOUZA-SCHOREY, C. D. Rho GTPases and signaling networks. **Genes and Development**, v.11, n.18, p. 2295-2322, 1997.
- ALBRECHT, J. H.; HANSEN, L. K. Cyclin D1 promotes mitogen-independent cell cycle progression in hepatocytes. **Cell Growth & Differentiation**, v.10, p.397-404, 1999.
- AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILLETT, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p.5258-5265, 1995.
- BACH, T. Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants- A review. **Lipids**, v. 30, p.191-202, 1995.
- BANNASCH, P.; ZERBAN, H. Tumors of the liver. **In: Pathology of Tumors in laboratory Animals**. V. S. Turusov, U. Mohr, Eds. Lyon, IARC Cientific Publications, n.99, v.1, p.199-240, 1990.
- BANNASH, P.; HAERTEL, T. SU, Q. S. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. **Toxicol. Pathol.**, v.31, p.134-139, 2003.
- BARCINSKI, M. A. Morte celular. **In: Oncologia Molecular**. FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. São Paulo: Atheneu, 2004.
- BASSI, A. M. A. et al. Protein and m-RNA expression of farnesyl-transferases, RhoA and RhoB in rat liver hepatocytes: action of perillyl alcohol and vitamin A in vivo, **Journal of Biomedical Science**, v.12, p.457-466, 2005.
- BENITAH, S. A. et al. Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1705, p.121-132, 2004.
- BENOWITZ, S. Liver Cancer Biomarkers Struggling to Succeed, **JNCI**, v.99, n.8, 590-591, 2007.
- BURSCH, W.; OBERHAMMER, F.; SCHULTE-HERMANN, R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. **TIPS**, v. 131, p. 245-251, 1992.
- 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.

CASEY, P. J.; SEABRA, M. C. Protein Prenyltransferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.10, p.5289-5292, 1996.

CARNESECCHI, S., SCHNEIDER, Y., CERALINE, J., DURANTON, B., GOSSE, F., et al. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 298, p. 197-200, 2001.

CARNESECCHI, S. et al. Perturbation by Geraniol of Cell Membrane Permeability and Signal Transduction Pathways in Human Colon Cancer Cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.202, n.2, p.701-715, 2002.

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.

CHAN, K. K. W.; OZA, A. M.; SIU, L. L. The statins as anticancer agents. **Clinical Cancer Research**, v.9, p.10-19, 2003.

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.

CHIARELLO, P. G. et al. Effect of a Necrogenic Dose of Diethylnitrosamine on Vitamin E-deficient and Vitamin E-supplemented Rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.929-935, 1998.

CHIPUK, J. E. et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. **Science**, v.303, n.5660, p. 1010-1014, 2004.

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.

COLEMAN, M. L., MARSHALL, C. J., OLSON, M. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. **Nature Reviews**, v.5, p. 355-366, 2004.

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.

CROWELL, P. L. et al. Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. **Biochemical Pharmacology**, v.47, n.8, p. 140-1415, 1994.

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.

CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J. Nutr.**, v.129, p. 775S-78S, 1999.

DANESH, F. R.; SADEGHI, M. M.; AMRO, N.; PHILIPS, C.; ZENG, L.; LIN, S.; SAHAI, A.; KANWAR, Y. S. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/ p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, n.12, p. 8301-8305, 2002.

DAVID-PFEUTY, T.; CHAKRANI, F.; ORY, K.; NOUVIAN-DOOGHE, Y. Cell cycle-dependent regulation of nuclear p53 traffic occurs in one subclass of human tumor cells and in untransformed cells. **Cell Growth & Differentiation**, v.7, p. 1211-1225, 1996.

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

DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; FIDALGO-NETO, A. A.; PAUMGARTTEN, F. J. R. In vitro inhibition of liver monooxygenase by b-ionone, 1,8-cineole, ( $\_$ )-menthol and terpineol. **Toxicology**, v.135, p.33-41, 1999.

DING, W.; YIN, X. Dissection of the multiple mechanisms of TF- $\alpha$ -induced apoptosis in liver injury. **Apoptosis Reviews Series**, v. 8, p. 445-454, 2004.

DUNCAN, R. E. et al. Geraniol and  $\beta$ -ionone inhibit proliferation, cell cycle progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.68, p.1739-1747, 2004.

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

DURKIN, M. E.; BAO-ZHU, Y.; SNORRI, S. T.; NICHOLAS, C. P. Gene structure, tissue expression, and linkage mapping of the mouse DLC-1 gene (*Arhgap7*). **Gene**, v.288, p.119-127, 2002.

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

ELSON, C. E. Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenóides: Protective roles in cancer and cardiovascular disease. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1666s-1672s, 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. E. et al. Geranylgeraniol and  $\beta$ -ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF- $\kappa$ B activation. **Carcinogenesis**, v.26, n.6, p.1091-1099, 2005.
- FABBRO, M.; HENDERSON, B. R. Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. **Exp. Cell. Res.**, v.282, p.59-69, 2003.
- 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.; RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. **Cancer Res.**, v. 51, p. 2751-61, 1991.
- FARBER, E.; SARMA, D. S. R. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Lab. Invest.**, v.56, p. 4-22, 1987.
- 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. 273-291, 1988.
- FEO, F. et al. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1765, n.2, p.126-147, 2005.
- FERLAY, J. et al. Globocan 2000: Cancer incidence and mortality worldwide. **IARC Cancer Bases**, IARC Press, n.5, 2001.
- FITCH, M. E. et al. Microbiological screening of mevalonate suppressive minor plant constituents. **J. Agric. Food. Chem.**, v.37, p.687-691, 1989.
- FONSECA, E.M.A.V.; CHAGAS, C.E.; MAZZANTINI, R.P.; HEIDOR, R.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. All-trans and 9-cis retinoic acids, retinol and beta-carotene chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve distinct actions on glutathione S-transferase positive preneoplastic lesions remodeling and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 11, p. 1940-1946, nov. 2005.
- GERL, R.; VAUX, D. L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. **Carcinogenesis**, v.26, n.2, p.263-270, 2005.
- GESCHER, A.; PANTORINO, U.; PLUMMER, S. M.; MANSON, M. M. Suppression of tumor development by substances derived from the diet- mechanisms and clinical implications. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v.45, p. 1-12, 1998.

GHITTONI, R. et al. Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases. **The FASEB Journal**, v.19, n.6, p.605-607, 2005.

GNAD, R.; KAINA, B.; FRITZ, G. Rho GTPases are involved in the regulation of NF-kappaB by genotoxic stress. **Exp. Cell. Res.**, v.264, n.2, p.244-249, 2001.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, p. 425-30, 1990.

GRASL-KRAUPP. B.; BURSCH, W.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; WAGNER, A.; LAUER, B.; SHULTE-HERRMANN, R. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p. 9995-9999, 1994.

GREEN, D. R.; AMARANTE-MENDES, G. P. The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. **Cell Differentiation**, v.24, p.45-61, 1998.

GUO, F.; ZHENG, Y. Involvement of Rho Family GTPases in p19Arf- and p53-Mediated Proliferation of Primary Mouse Embryonic Fibroblasts. **Molecular And Cellular Biology**, v.24, n.3, p.1426-1438, 2004.

HANCOCK, J. F.; MAGEE, A. I.; CHILDS, J. E.; MARSHALL, C. J. All ras proteins are isoprenylated but only some are palmitoylated. **Cell**, v. 577, p. 1167-1177, 1989.

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

HENNEKES, H.; NIGGS, E. A. The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins: A single point mutation prevents proteolytic cleavage of the lamin A precursor and confers membrane binding properties. **J. Cell. Sci.**, v.107, p. 1019-1029, 1994.

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

HOLSTEIN, S. A.; HOHL, R. J. Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression. **Journal of Lipid Research**, v.44, p.1209-1215, 2003.

HOLSTEIN, A. A.; WOHLFORD-LENANE, C. L.; HOHL, R. J. Isoprenoids influence expression of Ras and Ras-related proteins. **Biochemistry**, v.41, p.13698-13704, 2002.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, F. A. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 75, p. 734-8, 1981.

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. 545-551, 1997.

IO, N.; LIANG, Z. D.; CAO, L.; LEE, T. K. DLC-1 is deleted in primary hepatocellular carcinoma and exerts inhibitory effects on the proliferation of hepatoma cell lines with deleted DLC-1. **Cancer Res.**, v.1, n.60, p.6581-6584, 2000.

KAKIZOE, T. Chemoprevention of cancer-focusing on clinical trials. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 33, p. 421-442, 2003.

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.

KLAUDE, M. et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, v.363, p.89-96, 1996.

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

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

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.

KOOLMAN, J.; ROHM, K. Isoprenoids. In: **Color Atlas of Biochemistry**, Koolman, J.; Rohm, K.; Thieme, Stuttgart, p. 50-1, 1996.

KUROIWA, J. Atividade quimiopreventiva da tributirina na hepatocarcinogênese em ratos. 161 f. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LEEA, Y. S. et al. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca<sup>2+</sup> release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. **Cancer Letters**, v.186, p.83-91, 2002.

LEVRERO, M. et al. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. **Journal of Cell Science**, v.113, p.1661-1670, 2000.

LI, X. et al. inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.227, p.15309-15316, 2002.

LI, X. R. et al., Overexpression of RhoA is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **EJSO**, v.10, p.1-5, 2006.

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

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

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

LIU, J. R. et al. Inhibition of b-ionone on SGC-7901 cell proliferation and upregulation of metalloproteases-1 and -2 expression. **World J. Gastroenterol.**, v.10, n.2, p. 167-171, 2004b.

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

LUTZ, K. W.; SCHLATTER, J. The relative importance of mutagens and carcinogens in the diet. **Pharmacol. Toxicol.**, v.72, n.1, p.s104-s107, 1993.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Natures Reviews**, v.1, p.222-230, 2001.

MANGNALL, D.; BIRD, N. C.; MAJEED, A. W. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. **Liver International**, v.23, p.124-138, 2003.

MANSON, M. M., GESCHER, A., HUDSON, E. A., PLUMMER, S. M., SQUIRES, M. S., PRIGENT, S. A. Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. **Toxicol. Lett.**, v. 112-113, p. 499-505, 2000.

MARRERO, J. A. ; PELLETIER, S. Hepatocellular Carcinoma. **Clin. Liver Dis.**, v.10, p.339-351, 2006.

MARSHALL, C. J. Protein prenylation: A mediator of protein-protein interactions. **Science**, v. 259, p.1865-1866, 1993.

MARTINEZ-BOTAS, J. et al. Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonato derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1532, p.185-194, 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.

MAZZANTINI, R. Efeitos dos Triterpenóides ácidos oleanólico e ursólico em ratos F344 submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente".

2005. 163 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MEIGS, T.E.; IMONI, R.D. Farnesol as a regulator of HMG-CoA reductase degradation: characterization and role of farnesyl pyrophosphatase. **Arch. Biophys.**, v.345, p.1-9, 1997.

MCANALLY, J. A.; JUNG, M.; MO, H. Farnesyl-O-acetylhydroquinone and geranyl-O-acetylhydroquinone suppress the proliferation of murine B16 melanoma cells, human prostate and colon adenocarcinoma cells, human lung carcinoma cells, and human leukemia cells. **Cancer Lett.**, v. 202, p. 181-192, 2003.

MIHARA, M.; ERNTER, S.; ZAIKA, A.; PETRENKO, O.; CHITTENDEN, T.; PANCOSKA, P.; MOLL, U. M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. **Mol Cell.**, v.11, n.3, p.577-590, 2003.

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

MO, H., TATMAN, D., JUNG, M., ELSON, C. E. Farnesyl anthranilate suppresses the growth, in vitro and in vivo, of murine B16 melanomas. **Cancer Lett.**, v. 157, p. 145-53, 2000.

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.

MORENO, F. S.; ROSSIELO, M. R.; MANJESHWAR, S.; NATH, R.; RAO, P. M.; RAJALAKSHMI S.; SARMA, D. S. R. Effect of  $\beta$ -carotene on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. **Cancer Lett.**, v. 96, p. 201-8, 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.

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

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.

NAVES, M. M. V.; MORENO, F. S. Diferenciação celular: Importância na hepatocarcinogênese e papel modulador do  $\beta$ -caroteno. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.46, n.4, p.389-399, 2000.

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

NIKOLAEV, A.Y., LI, M., PUSKAS, N., QIN, J., GU, W. – Parc: a cytoplasmic anchor for p53. **Cell**, v. 112, p. 29-40, 2003.

NIU, Z. S.; LI, B. K.; WANG, M. Expression of p53 and c-myc genes and its clinical relevance in the hepatocellular carcinomatous and pericarcinomatous tissues. **World Journal of Gastroenterology**, v.5, n.5, p.822-826, 2002.

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

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.

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.

OHLSON, L. C. E.; KOROXENIDOU, L.; HALLSTROM, I. P. Inhibition of In Vivo Rat Liver Regeneration by 2-Acetylaminofluorene Affects the Regulation of Cell Cycle-Related Proteins. **Hepatology**, v.27, p.691-696, 1998.

OMS. Global strategy on diet, physical activity and health. **WHO**, 2004.

ONG, T. P.; HEIDOR, R.; DE CONTI, A., DAGLI, M. L., MORENO, F. S. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. **Carcinogenesis**, v.27, n.6, p.1194-1203, 2006.

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-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 11230-38, 1993.

PARK, H. et al. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA. **Circ. Res.**, v.91, p.143-150, 2002.

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

PATEL, T.; STEER, C. J.; GORES, G. J. Apoptosis and the liver: A mechanism of disease, growth regulation, and carcinogenesis. **Hepatology**, v.30, n.3, p.811-815, 1999.

PEFFLEY, D. M.; GAYEN, A. K. Plant-derived monoterpenes suppress hamster kidney cell 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase synthesis at the post-transcriptional level. **Journal of Nutrition**, v.133, p.38-44, 2003.

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.2280-2286, 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.

POLO, M. P.; DE BRAVO, M. G. Effect of geraniol on fatty-acid and mevalonate metabolism in the human hepatoma cell line Hep G2. **Biochem. Cell. Biol.**, v.84, n.1, p.102-111, 2006.

PRIVES, C.; HALL, P.A. The p53 pathway. **J. Pathol.**, v. 187, n. 1, p. 112–126, jan. 1999.

QURESHI, A. A. et al. Inhibition of mevalonate biosynthesis by the monoterpene d-limonene. **J. Agric. Food Chem.**, v.36, p.1220-1224, 1998.

RAVI, R.; BEDI, A. NF-kappaB in cancer--a friend turned foe. **Drug Resist Updat.**; v. 7, n.1, p.53-67, 2004.

REED, J. C. Double indefity for proteins of Bcl-2 family. **Nature**, v.387, p.773-776, 1997.

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

RIZZI, M.B.S.L.; DAGLI, M.L.Z.; JORDÃO Jr.; A.A.; PENTEADO, M.V.C.; MORENO, F.S.  $\beta$ -Carotene inhibits persistent and stimulates remodeling  $\gamma$ GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. **Internat. J. Vit. Nutr. Res.**, v.67, p. 415-422, 1997.

SACCHETTINI, J. C., POULTER, C. D. Creating isoprenoid diversity. **Science**, v.277, p. 1788-89, 1997.

SAFTOIU, A., CIUREA, T., GEORGESCU, C., BANITA, M., COMANESCU, V., ROGOVEANU, I., et al. Immunohistochemical assessment of proliferating cell nuclear antigen in primary hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 7, p. 436-446, 2003.

SANDAL, T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle ad cancer. **The Oncologist**, v.7, p.73-81, 2002.

SCITA, G.; TENCA, P.; FRITTOLI, E.; TOCCHETTI, A.; INNOCENTI, M.; GIARDINA, G.; FIORE, P. P. D. Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 2393 – 2398, 2000.

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. 643-645, 1987.

SHOFF, S. M., GRUMMER, M., YATVIN. M. B., ELSON, C. E. Concentration-dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. **Cancer Res.**, v.51, p. 37-42, 1991.

SHULTE-HERMANN, R.; et al., Cell proliferation and apoptosis in normal liver and preneoplastic foci. **Environ. Health Perspect.**, v.101, p.87-90, 1993.

SHULTE-HERMANN, R. et al. Concepts of cell death and application to carcinogenesis. **Toxicol. Pathol.**, v.25, p.89-93, 1997.

SILVEIRA, E. R. et al. Vitamin A and All-trans and 9-cis Retinoic Acids Inhibit Cell Proliferation During the Progression Phase of Hepatocarcinogenesis in Wistar Rats. **Nutrition and Cancer**, v.39, n.2, p.244-251, 2001.

SIPERSTEIN, M. D. Role os cholesterogenesis and isoprenóide synthesis in DNA replication ad cell growth. **J. Lipid Res.**, v.25, p.1462-1468, 1984.

SIDDALS, K. W. et al. Abrogation of insulin-like growth factor (IGF-I) and Insulin action by mevalonic acid depletion. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.37, p.38353-38359, 2004.

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-dioxinmediated tumour promotion in rat liver. **Carcinogenesis**, v.16, n.6, p.1271-1275, 1995.

STRYER, L. Biosynthesis of membrane lipids and steroid hormones. In: **Biochemistry**. L. STRYER, ed., W. H. Freeman and Co., NY, p.547-74, 1988.

SOLT, D. T.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p.702-703, 1976.

SPORN, M. B.; DUNLOP, N. M.; NEWTON, D. L.; SMITH, J. M. - Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Fed. Proc.**, v.35, p. 1332-1338, 1976.



STANLEY, L. A. Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumour suppressor genes. **Toxicology**, v.104, p.173-94, 1995.

TAO, L.; KRAMER, P.M.; WANG, W.; YANG, S.; LUBET, R.A.; STEELE, V.E.; PEREIRA, M.A.; Altered expression of c-myc, p16 and p27 in rat colon tumors and its reversal by short-term treatment with chemopreventive agents. **Carcinogenesis**, v.23, p.1447-1454, 2002.

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.

TATMAN, D.; MO, H. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. **Cancer Letters**, v.175, p.129-139, 2002.

TOKSOZ, D.; MERDEK, K. D. The Rho small GTPase: functions in health and disease. **Histol. Histopathol.**, v.17, n.3, p.915-927, 2002.

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

TROSKO, J. E. The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biomed. Pharmacother.**, v.59, p.S326-S331, 2005.

UEDA, N.; SHAH, S. Apoptosis. **J. Lab. Clin. Med.**, v.124, p.169-77, 1994.

VAN GIJSSEL, H. E. et al. 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, n.4, p.701-710, 2000.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, V. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v.36, p. 131-149, 2003.

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

WARD, R. et al. Impact of microsatellite testing and mismatch repair protein expression on the clinical interpretation of genetic testing in hereditary non-polyposis colorectal cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.128, n.8, p.403-411, 2002.

WATTENBERG, L. W.; SPARNINS, V. L.; BARANY, G. Inhibition of N-Nitrosodietethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. **Cancer Res.**, v. 49, p. 2689-2692, 1989.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Prev Med.**, v. 25, p. 44-45, 1996.

WILLET, W.C. Diet and health: what should we eat? **Science**, v.64, p.532-537, 1994.

WONG, C. et al. Genetic and epigenetic alteration of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. **Cancer Research**, v.63, p.7646-7651, 2003.

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, n.7, p.1169-1175, 1999.

WU, et al. Dietary corn oil promotes colon cancer by inhibiting mitochondria-dependent in azoxymethane-treated rats. **Exp Biol Med**, v.229, p.1017-1025, 2004.

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.

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

YOSHIDA, Y., NIKI, E., NOGUCHI, N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. **Chem. Phys. Lipids**, v. 123, p. 63-75, 2003.

YOUNG, M. R.; YANG, H-S.; COLBURN, N. H. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kB and Pcd4. **Trends in Molec. Med.**, v. 9, p. 36-41, 2003.

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

YU, S. G.; ANDERSON, P. J.; ELSON, C. E. Efficacy of  $\beta$ -ionone in the chemoprevention of rat mammary carcinogenesis. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 43, p. 2144-2147, 1995.

YU, S. G., HILDEBRANDT, L. A., ELSON, C. E. Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppress the growth of hepatomas e melanomas transplanted to rats and mice. **J. Nutr.**, v. 125, p. 2763-2767, 1995.

YU, J.; ZHANG, L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.331, n.3, p.851-858, 2005.

ZIMMERMAN, A. Regulation of liver regeneration. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v.19, p.s6-s10, 2004.