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

Atividade quimiopreventiva da tributirina na
hepatocarcinogênese em ratos

Joice Kuroiwa-Trzmielina

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2007

Joice Kuroiwa-Trzmielina

Atividade quimiopreventiva da tributirina na
hepatocarcinogênese em ratos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno
orientador/presidente

Prof^a. Tit. Maria Lúcia Zaidan Dagli
1^o. examinador

Prof. Dr. Thomas Prates Ong
2^o. examinador

São Paulo, 29 de março de 2007.

Aos meus pais Matsue e Toshio, por toda minha vida

Ao Renato, pela nova forma de vida

A vocês, dedico.

AGRADECIMENTOS

Esses agradecimentos são apenas uma pequena forma de retribuir as grandes contribuições para o meu crescimento profissional, e principalmente pessoal, que me foram concedidas por diversas pessoas. Esses agradecimentos são ainda, uma maneira de lembrar aqueles que me proporcionaram os muitos momentos de alegria ao longo desta minha trajetória.

Especialmente ao Professor Tit. e Orientador Fernando Salvador Moreno, que com muito mérito recebe tais qualificações, agradeço por ter me proporcionado a oportunidade de descobrir parte do maravilhoso mundo da pesquisa. Obrigada pelos seus inúmeros ensinamentos, traduzidos em conhecimento científico e lições para a vida, que com o seu dom de orientador e didática como professor, puderam efetivamente construir a base para minha formação científica. Seu entusiasmo e amor à pesquisa o tornam exemplo de dedicação.

Aos meus pais, agradeço pela oportunidade da vida e pela eterna e verdadeira preocupação com a minha felicidade. Para isso nunca mediram esforços, impossíveis de serem totalmente retribuídos, sempre me apoiaram, me incentivaram e com muito amor e paciência me trouxeram até aqui.

A minha irmã, Marcia, muito obrigada pelo seu companheirismo, cumplicidade, conselhos, risadas e até lágrimas, que me ensinaram muito e construíram grande parte da minha formação pessoal. Sinto-me privilegiada por tê-la como minha melhor amiga.

Ao meu amor, Renato que entrou na minha vida e mostrou que o tempo não é determinante da intensidade de sentimentos que podemos ter por alguém.

Agradeço pelo apoio, por não me deixar desistir dos sonhos, por me mostrar caminhos e principalmente, por hoje fazer parte da minha vida, tornando-a cada dia mais feliz, como meu marido.

Ao Professor Dr. Thomas Prates Ong, meus agradecimentos pela atitude de co-orientador desde a minha primeira visita ao laboratório, época em que tive o privilégio de conhecê-lo como um doutorando com a verdadeira vocação acadêmica.

À Professora Tit. Maria Lúcia Zaidan Dagli, do Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ-USP, agradeço pela oportunidade de conhecê-la, de aprender seus ensinamentos ao longo de todo mestrado e pelas grandes contribuições na minha banca de qualificação.

Aos “mais velhos” do laboratório: Renato, Rogério, Aline e Carlos, obrigada pelos conhecimentos, paciência, esforços que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Renato, Clarissa e Bianca, pela efetiva contribuição para os resultados deste trabalho; e aos demais do laboratório: Alessandra, Bruna, Camila, Douglas, Julianna, Juliana e Mônica pelos conhecimentos, apoio e incentivo.

A todos do Laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer meus sinceros agradecimentos pela amizade e atmosfera alegre, que com certeza registraram momentos muito felizes no meu coração e na minha memória.

Aos demais professores e aos muitos colegas do departamento, que sempre me ajudaram e me deram suporte ao longo desta jornada. Aos funcionários: Lurdinha, por manter a ordem no laboratório, e com a Joana, por cuidarem do departamento; obrigada Cléo, Edílson e Mônica, do B14, Elaine e Jorge, da seção de pós, por literalmente nos “pajear” e nos socorrer sempre.

Aos funcionários do biotério, pelos cuidados despendidos com os animais e pelo suporte que me foi dado em fase tão importante. Agradeço também a todos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP e do Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ-USP, pelo apoio essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Cica (in memoriam), pela inspiração que me guiou para esse caminho. Aos demais amigos e familiares, muito obrigada pelos conselhos.

Às agências de fomento, CAPES, pela concessão da minha bolsa, FAPESP e CNPQ pelo suporte financeiro ao laboratório, sem os quais não seria possível completar essa jornada.

RESUMO

KUROIWA-TRZMIELINA, J. **Atividade quimiopreventiva da tributirina na hepatocarcinogênese em ratos**. 2007. 167 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

No presente estudo avaliou-se a atividade quimiopreventiva da tributirina (T), pró-fármaco do ácido butírico (AB) e presente naturalmente em leite e derivados, quando administrada a ratos Wistar durante as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” (RH). Os animais receberam diariamente, durante 8 semanas consecutivas e por entubação gástrica: T (200 mg/100 g de peso corpóreo [p.c.]; grupo TB) ou maltodextrina (300 mg/100 g de p.c.; grupo MD; controle isocalórico). Duas semanas após o início dos tratamentos, os grupos foram submetidos ao modelo do RH. Esse consistiu na aplicação intraperitoneal de uma dose do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN, 20 mg/100 g de p.c.), seguida, 2 semanas após, da aplicação de 4 doses consecutivas de 2-acetilaminofluoreno (AAF; 2 mg/100 g de p.c.) e de uma hepatectomia parcial (HP) a 70%, acrescida de 2 doses de AAF (2 mg/100 g de p.c.) 2 e 4 dias após a cirurgia. Decorridas 6 semanas após a iniciação com DEN, os animais foram eutanasiados administrando-se, entretanto, 2 horas antes desse procedimento 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) (10 mg/100 g de p.c.). De acordo com a análise macroscópica dos fígados, e em comparação ao grupo MD, verificou-se que o grupo TB apresentou menor multiplicidade ($p < 0,05$) e tamanho ($p < 0,05$) de lesões pré-neoplásicas (LPN) hepáticas. Em relação à análise morfométrica das LPN

hepáticas positivas para a enzima glutathione S-transferase forma placentária (GST-P) totais (persistentes + em remodelação) e também nas LPN hepáticas GST-P positivas persistentes, observou-se que em comparação ao grupo MD, o TB apresentou menor tamanho ($p < 0,05$) e área do corte ocupada ($p < 0,05$) por essas lesões. O grupo TB apresentou maior porcentagem ($p < 0,05$) de LPN hepáticas GST-P positivas em remodelação e maior número ($p < 0,05$) de corpúsculos apoptóticos (CA) nessas LPN em comparação ao MD. Não houve diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos MD e TB em relação à proliferação celular e aos danos no DNA. De acordo com a imunohistoquímica para p53, o grupo TB apresentou menor porcentagem ($p < 0,05$) de LPN hepáticas totais e persistentes positivas para a proteína, comparado ao MD. O grupo TB apresentou menor ativação ($p < 0,05$) do fator nuclear- κ B (NF- κ B) quando comparado ao MD. O grupo TB tendeu a apresentar maior acetilação de histona H3 resíduo de lisina 9 (H3K9) em relação ao grupo MD. A T apresentou atividade quimiopreventiva promissora quando administrada a ratos Wistar diariamente e durante 8 semanas, abrangendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do RH. Inibição de LPN hepáticas GST-P positivas persistentes, indução da remodelação e da apoptose, além de normalização da função de p53, inibição da ativação do NF- κ B e indução da acetilação de H3K9 parecem estar envolvidas com as ações anticarcinogênicas da T.

Palavras-chave: quimioprevenção, hepatocarcinogênese, tributirina, p53, NF- κ B, histona.

ABSTRACT

KUROIWA-TRZMIELINA, J. **Chemopreventive activity of tributyrin in hepatocarcinogenesis in rats**. 2007. 167 p. Master's degree dissertation – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2007.

Chemopreventive activity of tributyrin (T), a butyric acid prodrug found in milk and its derivatives, was evaluated during the initial phases of the “Resistant Hepatocyte” (RH) model of hepatocarcinogenesis. During 8 consecutive weeks, rats received T (200 mg/100 g body weight; TB group) or maltodextrin (M; 300 mg/100 g body weight; MD group; isocaloric control). Two weeks after the beginning of the treatments, the animals received one dose of diethylnitrosamine (DEN; 20 mg/100 g body weight) for initiation. Two weeks later, the animals received six doses of 2-acetylaminofluorene (AAF, 2 mg/100 g body weight), 4 consecutive doses before partial (2/3) hepatectomy and the remaining, two and four days after surgery. All animals were euthanized 6 weeks after DEN administration. Two hours before euthanasia, rats received 5-bromo-2-desoxyuridine (BrdU) (10 mg/100 g body weight). Multiplicity and area of visible hepatocyte nodules/animal were smaller ($p < 0,05$) in TB group, compared to MD group. Mean area and % liver section area occupied by total (persistent + remodeling) hepatic placental glutathione S-transferase (GST-P) positive preneoplastic lesions (PNL) and persistent hepatic GST-P positive PNL were smaller ($p < 0,05$) in TB group, compared to control group. Compared to MD group, TB group presented increased ($p < 0,05$) % of remodeling hepatic GST-P positive PNL and increased number of apoptotic bodies in these PNL.

No differences ($p > 0,05$) were observed between MD and TB groups regarding cell proliferation and DNA damage. TB group presented reduced ($p < 0,05$) % of total and persistent PNL p53 positive compared to MD group. TB group presented reduced ($p < 0,05$) nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation in comparison with MD group. Lysine 9 acetylation site in H3 (H3K9) tended to be increased in TB group compared to MD. These results indicate that T represents promising chemopreventive agent against hepatocarcinogenesis when administered to Wistar rats during 8 consecutive weeks on initial phases of RH model. Persistent hepatic GST-P positive PNL inhibition, remodeling and apoptosis induction, p53 function normalization, inhibition of NF- κ B activation and H3K9 acetylation can be involved with antineoplastic T actions.

Key-words: chemoprevention, hepatocarcinogenesis, tributyrin, p53, NF- κ B, histone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da estrutura das histonas no nucleossomo. a. Histonas H2A, H2B, H3 e H4 enroladas pelo DNA para formar o nucleossomo. Observar a região amino-terminal em vermelho. b. Mapa de algumas modificações das histonas. Resíduos de lisina (K) da H2A, H2B, H3 e H4 são sítios potenciais para a ação das HAT/HDAC. A = acetilação; C = região carboxi-terminal; E = ácido glutâmico; M = metilação; N = região amino-terminal; P = fosforilação; S = resíduo de serina; Ub = ubiquitinação. Adaptado de MARKS et al. (2001)	29
Figura 2	Esquematização da hidrólise de uma molécula de tributirina pela lipase pancreática para dar origem a 3 moléculas de AB	55
Figura 3	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da atividade quimiopreventiva da T abrangendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	63
Figura 4	Curva de evolução do peso corpóreo de ratos Wistar do grupo Normal e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	83
Figura 5	Consumo de ração de ratos Wistar do grupo Normal e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	84

Figura 6	Fotografia digital de fígado do grupo controle MD. Observar a presença de LPN hepáticas, em forma de nódulos de hepatócito, indicadas pelas setas	88
Figura 7	Fotografia digital de fígado do grupo TB. Observar a presença de LPN hepáticas, em forma de nódulos de hepatócito, indicadas pelas setas	89
Figura 8	Fotomicrografia de corte histológico de fígado do grupo MD. Verificar imunomarcação pela GST-P em foco de hepatócito considerado como “persistente” (observar bordas definidas e marcação uniforme). Objetiva de 10X	92
Figura 9	Fotomicrografia de corte histológico de fígado do grupo MD. Verificar imunomarcação pela GST-P em foco de hepatócito considerado como “em remodelação” (observar bordas irregulares e marcação não-uniforme no interior do foco). Objetiva de 10X	92
Figura 10	Fotomicrografia de corte histológico de fígado do grupo MD. Verificar a presença de foco acidofílico (A) e basofílico (B). Coloração com H&E. Objetiva de 10X	95
Figura 11	Fotomicrografia de corte histológico de fígado do grupo TB. Verificar a presença de foco de células claras. Coloração com H&E. Objetiva de 10X	96
Figura 12	Fotomicrografia de corte histológico de fígado. A. Verificar a presença de proliferação de células ovais escassa no grupo TB (A) e abundante no grupo MD (B). Coloração com H&E. Objetiva de 10X.	97

Figura 13	Fotomicrografias de corte histológico de fígado do grupo MD. Verificar dupla-marcação imunoistoquímica para GST-P (rosa) e BrdU (marrom). A. As setas indicam marcações para BrdU em LPN hepática persistente GST-P positiva. Objetiva de 10X. B. Detalhe da marcação para BrdU em núcleos de hepatócitos. Objetiva de 40X	99
Figura 14	Fotomicrografias de corpúsculo apoptótico detectado em corte histológico de fígado corado com H&E do grupo MD. A seta indica o corpúsculo apoptótico observado em luz transmitida normal (A) e em microscopia de fluorescência (B). Objetiva de 40X	102
Figura 15	Fotomicrografia de cometa do grupo MD. Objetiva de 10X	104
Figura 16	Fotomicrografias de corte histológico de fígado do grupo MD. A. LPN persistente marcada para p53. Objetiva de 10X. B. Detalhe de LPN persistente marcada para p53. Objetiva de 20X. C. A seta indica imunomarcação citoplasmática de p53 em hepatócitos de uma LPN persistente. Objetiva de 40X	106
Figura 17	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	107
Figura 18	“Western blotting” da proteína p65 de extratos nucleares de fígado do grupo Normal e dos grupos MD e TB. As bandas estão na altura de 65 kDa, correspondente ao p65	109
Figura 19	Normalização do “western blotting” da proteína p65 em relação ao carregamento de proteínas na membrana. Os valores (média $\pm$ desvio padrão) estão expressos em	110

unidades densitométricas arbitrárias. $p < 0,05$ t de Student para amostras independentes (^a vs grupo Normal; ^b vs MD)

Figura 20 “Western blotting” de H3K9 acetilada de fígado do grupo Normal e dos grupos MD e TB. As bandas estão na altura de 17 kDa, correspondente à H3 112

Figura 21 Representação gráfica da densitometria das bandas de H3K9 acetilada. Os valores (média $\pm$ desvio padrão) estão expressos em unidades densitométricas arbitrárias 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pesos corpóreos e dos fígados e consumo de ração de ratos Wistar do grupo Normal e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	86
Tabela 2	Incidência, multiplicidade e porcentagem por tamanho de LPN hepáticas visíveis à macroscopia observadas por ocasião da eutanásia de ratos Wistar tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	87
Tabela 3	Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas totais (persistentes + em remodelação) de ratos Wistar tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	90
Tabela 4	Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas persistentes de ratos Wistar tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	91
Tabela 5	Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas em remodelação de ratos Wistar tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	93

Tabela 6	Quantificação de núcleos de hepatócitos marcados imunoistoquimicamente para BrdU por mm ² de fígado de ratos do grupo Normal e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	100
Tabela 7	Quantificação de CA no grupo Normal e “surrounding”, LPN hepáticas GST-P positivas totais (persistentes + em remodelação), persistentes e em remodelação dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	101
Tabela 8	Comprimento dos cometas (μm) do grupo Normal, (controle negativo), grupo C+ e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	103
Tabela 9	Porcentagem de LPN hepáticas totais (persistentes + em remodelação), persistentes ou em remodelação com marcação imunoistoquímica citoplasmática para p53 do grupo Normal e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'-Me-DAB = 3'-metil-4-dimetilaminoazobenzeno

AAF= 2-acetilaminofluoreno

AB = ácido butírico

ACF = focos de criptas aberrantes

AGCC = ácido graxo de cadeia curta

AOM = azoximetano

ATPase = adenosina trifosfatase

BrdU = 5-bromo-2-deoxiuridina

CA = corpúsculos apoptóticos

CDK's = quinases dependentes de ciclina

DAB = diaminobenzidina

DEN = dietilnitrosamina

DMH = 1,2-dimetilhidrazina

DMSO = dimetilsulfóxido

E = eutanásia

FAT = acetiltransferase de fator de transcrição

γ GT = γ -glutamyltranspeptidase

GST-P = glutathione S-transferase forma placentária

H&E = hematoxilina de Harris e eosina

H3K9 = histona H3 resíduo de lisina 9

HAT = enzima acetiltransferase de histona

HBV = vírus da hepatite B

HCV = vírus da hepatite C

HDAC = enzima desacetilase de histona

HDACi = inibidor da desacetilase de histona

HP = hepatectomia parcial

HRP = "Horseradish Peroxidase"

IARC = "International Agency for Research on Cancer"

ILSI = "International Life Sciences Institute"

INCA = Instituto Nacional do Câncer

I κ B = proteína inibitória κ B

K = resíduo de lisina

LPN = lesões pré-neoplásicas

M = maltodextrina

MD= grupo maltodextrina

NF- κ B = fator nuclear κ B

NMU = nitrosometiluréia

OM = óleo de milho

p.c. = peso corpóreo

PBS = solução salina tamponada com fosfato

PCD = morte celular programada

RH = Hepatócito Resistente

ROS = espécies reativas de oxigênio

S = resíduo de serina

T = tributirina

TB = grupo tributirina

TCA = ácido tricloroacético

UV = ultravioleta

WCRF = "World Cancer Research Foundation"

WHO = "World Health Organization"

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1 Aspectos epidemiológicos do câncer	21
1.2 Carcinogênese	23
1.3 Hepatocarcinogênese e modelo do “Hepatócito Resistente” (RH)	40
1.4 Quimioprevenção do câncer	45
1.5 Ácido butírico e tributirina	48
 2 OBJETIVOS	 57
 3 MATERIAL E MÉTODOS	 60
3.1 Animais	60
3.2 Modelo de Hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” (RH)	61
3.3 Protocolo Experimental	62
3.4 Aplicação da BrdU e eutanásia dos animais	64
3.5 Exame macroscópico	64
3.6 Análise morfológica de LPN hepáticas GST-P positivas	66
3.6.1 Marcação imunoistoquímica da GST-P	66
3.6.2 Procedimento para quantificação de LPN GST-P positivas	67
3.7 Exame histopatológico	68
3.8 Avaliação da proliferação celular	69
3.9 Avaliação da apoptose	71
3.10 Avaliação de danos no DNA hepático	72
3.11 Imunoistoquímica para p53	73
3.12 Avaliação da ativação do fator de transcrição NF- κ B	75
3.12.1 Preparação e quantificação do extrato protéico nuclear	75
3.12.2 Western blotting de p65	76

3.13 Avaliação da acetilação de H3K9	78
3.13.1 Extração ácida de histonas	78
3.13.2 Quantificação do extrato protéico	79
3.13.3 Western blotting de H3K9 acetilada	79
3.14 Análise estatística	80
4 RESULTADOS	82
4.1 Evolução do peso corpóreo	82
4.2 Exame macroscópico dos fígados	86
4.3 Análise morfológica de LPN hepáticas GST-P positivas	90
4.4 Avaliação histopatológica	93
4.5 Quantificação da proliferação celular	98
4.6 Quantificação da apoptose	100
4.7 Quantificação de danos no DNA	103
4.8 Imunoistoquímica para p53	105
4.9 Quantificação da ativação do fator de transcrição NF- κ B	108
4.10 Quantificação da acetilação de H3K9	111
5 DISCUSSÃO	114
6 CONCLUSÕES	133
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aspectos epidemiológicos do câncer

“O câncer é um problema de saúde pública mundial, pois afeta a todos: o jovem e o idoso, o rico e o pobre, homens, mulheres e crianças” (“World Health Organization” - WHO, 2006).

Desde 1971, quando houve a declaração da “Guerra ao Câncer” no National Cancer Act, pesquisadores da área concluíram que o câncer não era uma simples doença, mas de fato, um complexo grupo de doenças resultantes, em parte, de mutações genéticas que controlam o crescimento e o comportamento celular, e em parte de interações entre essas mutações genéticas e o estresse celular provenientes de fatores ambientais e comportamentais, incluindo estilo de vida e escolha da alimentação (PERERA, 1996).

Assim, o câncer abrange diversos tipos de alterações celulares de diferentes origens e graus de malignidade (GREAVES, 2002). As alterações são caracterizadas por mudanças na expressão gênica, distúrbios na proliferação celular, invasão a outros tecidos e comprometimento das funções celulares normais (FENECH, 2002; LOEB; LOEB; ANDERSON, 2003).

Anualmente, mais de 11 milhões de casos novos de câncer são diagnosticados mundialmente, com estimativa de aumento de 50% até 2020 (WHO, 2006).

Como 2ª causa de morte no mundo, o câncer em 2005 foi responsável por 13% do total de óbitos, totalizando mais de sete milhões em todo o mundo. Desse total, mais de 70% ocorreram em países de média e baixa renda, ocasionados principalmente pelos cânceres de: pulmão (mais de um milhão de mortes), estômago (cerca de um milhão) e fígado (mais de 600 mil). Estima-se ainda que em 2015 o número total de óbitos pela doença atinja nove milhões e mais de 11 milhões em 2030 (WHO, 2006).

Esses números crescentes estão relacionados principalmente com o envelhecimento da população global e com a adoção de estilos de vida cada vez mais “ocidentalizados”, incluindo a alimentação (WHO e “International Agency for Research on Cancer” - IARC). As mesmas organizações alertam ainda que devido a esses fatores, essa doença logo será a principal causa de morte em diversos países.

Acompanhando a tendência mundial, o câncer atualmente é responsável por 13% dos óbitos no Brasil (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 1999), e é considerado um problema de saúde pública (KLIGERMAN, 2002). As duas últimas décadas já mostraram aumento de 50% na incidência dessa doença (INCA, 1999). Para o ano de 2006, estimam-se 472.050 novos casos no país. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele não melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e de mama e colo do útero para o sexo feminino.

Assim, foram esperados para o Brasil em 2006, 234.570 casos novos para o sexo masculino e 237.480 para sexo feminino. O câncer de pele não melanoma (116 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelo câncer de mama feminina (49 mil), próstata (47 mil), traquéia, brônquios e pulmão (27 mil), cólon e reto (25 mil), estômago (23 mil) e colo do útero (19 mil).

As neoplasias malignas mais incidentes para o sexo masculino, serão devidas ao câncer de pele não melanoma (55 mil casos novos), próstata (47 mil), traquéia, brônquio e pulmão (18 mil), estômago (15 mil), cólon e reto (11 mil). Para o sexo feminino, destacam-se cânceres de pele não melanoma (61 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (19 mil), cólon e reto (14 mil) e traquéia, brônquio e pulmão (nove mil) (INCA, 2006).

1.2 Carcinogênese

Existem mais de 100 tipos e subtipos de neoplasias, que podem ser classificadas em benignas ou malignas. As primeiras apresentam uma proliferação celular localizada e circunscrita, exercendo pressão nos tecidos adjacentes, mas que não ultrapassam suas divisas. Em contraste, neoplasias malignas ou cânceres têm a capacidade de invadir e se multiplicar em diferentes partes do organismo (HANAHA; WEINBERG, 2000).

Descreve-se que o desenvolvimento do câncer consiste em um processo longo envolvendo múltiplas etapas na transformação das células normais em malignas, requerendo para isto cerca de metade a 2/3 da vida das diferentes espécies (FARBER, 1990), ou de 20 a 40 anos, especialmente no caso de neoplasias sólidas em humanos (LOEB; LOEB; ANDERSON, 2003).

Assim, esse processo complexo do desenvolvimento de neoplasias, ou também chamado de carcinogênese, pode ser entendido como um aumento autônomo do número de células, independente de estímulos por fatores extra-

celulares tais como hormônios, ao contrário da hiperplasia, que por definição consiste na proliferação de células tecido-específicas, dependente de tais fatores de estimulação (BANNASCH, 1986; BANNASCH; ZERBAN, 1990).

A carcinogênese pode ser dividida em múltiplas etapas, que basicamente se classificam em: iniciação, promoção e progressão (PITOT, 2001; YOUNG; YANG; COLBURN, 2003). Essas etapas podem ser induzidas por agentes de natureza física (carcinogênese física), biológica (carcinogênese biológica) e química (carcinogênese química) (YOUNG; YANG; COLBURN, 2003).

A iniciação é definida como uma fase com mudanças irreversíveis nas células (PITOT; DRAGAN, 1991), caracterizada por diversas modificações moleculares, incluindo danos no DNA (FARBER; SARMA, 1987) e mutações em genes específicos, como genes supressores de tumor e oncogenes (POIRIER, 2004). No caso da carcinogênese física, que pode ser induzida por radiação, a iniciação é consequência das ações diretas ou indiretas de fótons de elevada energia ou partículas sobre o DNA existente. Já na carcinogênese biológica, o agente iniciante consiste de macromoléculas com peso molecular relativamente elevado, DNA ou RNA, responsáveis pela transmissão de informação; diferentemente da carcinogênese de origem química, que envolve moléculas de menor peso molecular em ação direta com o DNA celular, ou indireta, pelo seu metabólito ativo (PITOT; DRAGAN, 1991).

Assim, carcinogênicos químicos eletrofílicos podem reagir diretamente com o DNA, pertencendo à pequena classe dos carcinogênicos diretos, como por exemplo, o óxido de etileno ou derivados nitrogenados da mostarda. Em contrapartida, componentes quimicamente inertes ou nucleofílicos, como as aminas aromáticas e heterocíclicas, as N-nitrosaminas, entre outros, requerem conversão enzimática e

são então chamados pró-carcinogênicos (LUCH, 2005). Para tanto, é necessária a ação de enzimas da fase I de biotransformação, podendo-se destacar as do sistema citocromo P450, CYPs. Reações de fase I envolvem oxidação, redução e hidroxilação tornando a molécula mais hidrofílica e suscetível à destoxificação. Assim, embora muitas vezes essas reações ativem o carcinogênico, em alguns casos podem também resultar em sua inibição. Já as reações de fase II de biotransformação, que envolvem enzimas como a glutathione S-transferase e UDP-glicuronil transferase, resultam em conjugação de moléculas como a glutathione com metabólitos de fase I de biotransformação, tornando estes últimos mais polares e passíveis de excreção (VERHOEVEN et al., 1997). Vale lembrar que todas essas enzimas não se encontram igualmente distribuídas no organismo, caracterizando a ação órgão-alvo dos carcinogênicos (LUCH, 2005).

Assim, agentes que causam danos ao DNA atuam por mecanismo genotóxico, pois formam adutos de DNA. Porém, somente a formação de adutos não é suficiente para que ocorra a transformação maligna (POIRIER, 2004). É necessário replicação do DNA, seguida de divisão celular, de modo a converter o dano químico em alterações herdáveis denominadas de mutações (BERTRAM, 2000; MARTINEZ et al., 2003). Essas mutações, caso não eliminadas pelo sistema de reparo, podem originar no genoma transições, transversões e pequenas deleções (PITOT, 2001). Assim, para que haja formação da neoplasia, é essencial que ocorra um ciclo de proliferação celular para que a mutação seja fixada de modo a causar uma iniciação (FARBER; SARMA, 1987).

Muitos carcinogênicos não causam somente a iniciação, mas podem induzir todas as etapas do desenvolvimento neoplásico, e assim são chamados carcinogênicos completos (LUCH, 2005). A dietilnitrosamina (DEN) e o 2-

acetilaminofluoreno (AAF) são exemplos de carcinogênicos químicos completos de ação indireta, bioativados no fígado principalmente pelas enzimas CYP2E1 e CYP1A2, respectivamente (VERNA; WHYSNER; WILLIAMS, 1996a; VERN; WHYSNER; WILLIAMS, 1996b).

A próxima etapa após a iniciação é a promoção, estágio reversível e caracterizado por expansão clonal das células iniciadas (PITOT, 2001). Essas formam um substrato para as mutações subseqüentes, que darão origem a células pré-neoplásicas (LPN), e assim lesões neoplásicas (KLAUNIG; KAMENDULIS; XU, 2000; LOEB; LOEB; ANDERSON, 2003). Nessa fase os carcinogênicos também podem atuar por mecanismo não-genotóxico, que envolve mudanças na expressão de diversos genes envolvidos com ciclo celular e diferenciação, inflamação e imunossupressão (LUCH, 2005). É importante ressaltar que devido à característica de reversibilidade dessa etapa, é necessário estímulo constante do agente promotor para que a carcinogênese progrida (PITOT, 2001). Exemplos de agentes que atuam somente nessa fase são: fenobarbital, bifenil policlorados, e hormônios como o estradiol (KLAUNIG; KAMENDULIS; XU, 2000; WILLIAMS, 2001).

Como último estágio da carcinogênese, a progressão é definida como um processo no qual uma ou mais proliferações focais evoluem para uma neoplasia maligna (FARBER; SARMA, 1987). É uma fase representada pela instabilidade cariotípica e uma contínua evolução de características independentes, tais como mudanças bioquímicas e estruturais nas células malignas, aumento na proliferação celular, invasão e metástase (PITOT, 2001; YOUNG; YANG; COLBURN, 2003).

Recentemente foi discutida uma nova hipótese para a carcinogênese, sugerindo que modificações epigenéticas em células normais determinam o efeito dos subseqüentes insultos genéticos. Geralmente caracterizados como

conseqüência do processo neoplásico, novas hipóteses questionam sua influência também como causa da carcinogênese (FEINBERG; TYCKO, 2004), aumentando a predisposição a determinadas mutações (JONES, 2003). Além disso, há descrições de que os as alterações epigenéticas são responsáveis pela progressão do tumor (CARBONE et al., 2004).

A herança epigenética é definida como uma informação celular diferente da própria seqüência de DNA, e é herdada durante a divisão celular. Há três principais tipos inter-relacionados de herança epigenética: metilação do DNA, “imprinting” genômico e modificações nas histonas (FEINBERG; TYCKO, 2004)

O DNA de eucariotos é condensado e ordenado em uma estrutura dinâmica denominada cromatina. Essa estrutura é formada por unidades básicas de repetição, os nucleossomos, que consistem de aproximadamente duas voltas de DNA enrolados em torno de um octâmero formado por pares de proteínas histonas: H2A, H2B, H3 e H4. Os nucleossomos repetitivos agrupam-se numa estrutura maior ligada por uma histona H1. Histonas são proteínas constituídas principalmente por um domínio que se exterioriza do nucleossomo, a região amino-terminal; e um domínio carboxi-terminal (TURNER, 2005) (**Figura 1.a**).

A região amino-terminal pode sofrer diversas modificações pós-transcricionais tais como acetilação, ubiquitinação e metilação dos resíduos de lisina (K); fosforilação de resíduos de serina (S) e treonina e metilação de resíduos de arginina. Existe uma variedade de combinações possíveis entre essas modificações e outras, formando uma complexa rede de comunicação ligada a diversos processos biológicos, que ainda permanece em grande parte desconhecida (FISCHLE; WANG; ALLIS, 2003).

Como a modificação mais estudada, a acetilação de histonas pode estar presente na H2A, H2B, H3 e H4. Na histona H3, podem ser acetilados os resíduos de lisina (K) 9, 14, 18, 23 e 27 e na H4, as lisinas 5, 8, 12 e 16 (SANTOS-ROSA; CALDAS, 2005) (**Figura 1.b**).

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

Nesse sentido, a acetilação de histonas, que pode apresentar-se hiperacetilada em todos os resíduos de lisina, está associada à ativação da transcrição, e assim relacionada com a eucromatina. Já o estado de hipoacetilação, e particularmente a acetilação da H4K12, estão envolvidos com o silenciamento transcricional, presente na heterocromatina (GRUNSTEIN, 1997; STRUHL, 1998). Dentre as modificações que geralmente estão presentes na heterocromatina estão a hipoacetilação e a metilação da H3K9. Em contraste, a ativação global é caracterizada pela hiperacetilação da H4K16 e fosforilação de H3S10 (FISCHLE; WANG; ALLIS, 2003).

A regulação do estado de acetilação das histonas é comandada pelas enzimas acetilases de histonas (HAT) e desacetilases de histonas (HDAC) (**Figura 1.b**). Existem três classes de HDAC. Na classe I estão as HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8; na classe II estão as HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10; na classe III encontra-se a SIRT (DAVIE, 2003).

A ruptura do equilíbrio entre as enzimas HAT e HDAC pode levar à perda da atividade normal da célula, e em última instância, ao câncer (CHUNG, 2002). Dentre as causas desse desequilíbrio estão as mutações nos genes que codificam para as

HATs e superexpressão de HDACs, com subsequente hipoacetilação de histonas e silenciamento gênico (FRAGA et al., 2005; SANTOS-ROSA; CALDAS, 2005). Foram demonstrados superexpressão da HDAC1 e HDAC2 no câncer de cólon, e em alguns casos de câncer de mama (KAWAI et al., 2003; ÖZDAĞ et al., 2006). Outra observação comum é a perda da acetilação da H4K16, observada em fases precoces de vários tipos de câncer, e quando associada à trimetilação da H4K20, constitui um marcador tumoral (FRAGA et al., 2005).

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

O desbalanço na acetilação de histonas pode modificar a estrutura da cromatina e levar à perda da regulação da transcrição de genes que controlam o ciclo celular, a apoptose, e a diferenciação (MARKS et al., 2001).

Descreve-se que alterações em genes específicos são responsáveis pela carcinogênese: oncogenes, genes supressores de tumor e genes de estabilidade. Desta maneira, essas modificações, sejam elas genéticas ou epigenéticas, podem causar a ativação de oncogenes de forma constitutiva ou não encontrada normalmente; e a inativação ou a diminuição da atividade de genes supressores de tumor, estimulando o processo neoplásico. Esses eventos acarretam aumento da proliferação, inibição da morte celular e facilidade na provisão de nutrientes pela angiogênese. Além disso, mutações em genes de estabilidade, como o “mismatch-repair” ou “nucleotide-excision repair” podem reduzir a capacidade de reparo de danos ao DNA, que predispõe à ação dos carcinogênicos (FRIEDBERG, 2003; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

Hanahan e Weinberg (2000) enumeraram seis alterações essenciais na fisiologia das células que compõem um câncer, que em conjunto, ditam seu crescimento seu maligno: 1) crescimento auto-suficiente, isto é, independente de fatores de crescimento, 2) insensibilidade aos fatores inibitórios do crescimento, 3) não-responsividade à programação de morte celular (apoptose), 4) potencial replicativo sem limites, 5) angiogênese, 6) invasão e metástase.

O câncer é freqüentemente associado a uma disfunção do ciclo celular (MALUMBRES; BARBACID, 2001). Esse consiste em um processo pelo qual a célula se divide e é normalmente regulado por sinais extracelulares que estimulam a expressão de determinados genes e a ativação de proteínas regulatórias (SHERR; MCCORMICK, 2002).

Deste modo, para que ocorra a divisão celular um processo complexo é iniciado, em que várias proteínas são ativadas, podendo-se destacar fatores de crescimento e seus receptores, bem como proteínas que estimulam a proliferação e o desenvolvimento da célula normal. Assim, a divisão celular é positivamente regulada ou estimulada por meio de vias sinalizadoras (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). Apresentam papel central na proliferação celular as quinases dependentes de ciclina (CDKs), que regulam a progressão pelas fases do ciclo celular, composta pelas etapas G1, S, G2 e M. A fase G1 antecede a síntese de DNA, que ocorre na fase S. Já a fase G2 antecede a mitose, ou seja, a fase M, em que ocorre a divisão celular propriamente dita (MALUMBRES; BARBACID, 2001).

A maior parte das células adultas normais, no entanto, responde aos sinais inibitórios de crescimento celular e pode permanecer quiescente em G0, ou ser levada a um estado pós-mitótico, geralmente associado à aquisição de traços de diferenciação celular (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000).

Na carcinogênese, freqüentemente há uma ativação aberrante do ciclo celular, alcançada pelo aumento da expressão, ou mutação de genes estimuladores, como os proto-oncogenes; aliada à inativação dos genes inibidores, tais como os genes supressores de tumor, causada também por mutações, ou diminuição de sua expressão (TESSEMA; LEHMANN; KREIPE, 2004). Vale ressaltar que mutações ou modificações na expressão desses genes conferem à célula vantagens de crescimento e desenvolvimento em relação às normais (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Os proto-oncogenes estão relacionados com a divisão e diferenciação celular normal. Uma vez ativados em oncogenes, podem atuar em vias intracelulares

envolvidas com o controle da proliferação celular, sem a necessidade de estímulos externos. Exemplos de proto-oncogenes são o c-myc e c-Ha-ras (NEMETH et al., 2003). Já os genes supressores de tumor, ou anti-oncogenes, estão envolvidos com a inibição do ciclo celular e da expressão do fenótipo maligno (VENITT, 1994). Exemplos clássicos desse tipo de gene são TP53 e RB (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

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

Vale também ressaltar a importância da atuação do microambiente para o desenvolvimento da neoplasia. Sua influência pode ser observada principalmente na fase de progressão, claramente dependente da angiogênese (KALLURI; ZEISBERG, 2006).

Os diversos processos de morte celular também constituem fenômeno biológico importante. Dentre eles, a autofagia caracteriza um tipo de morte celular programada (“programmed cell death” - PCD) que ocorre em resposta ao estresse celular que leva a um processo de reciclagem de componentes intracelulares, acompanhado por vacuolização autofágica massiva do citoplasma (KONDO et al., 2005; KROEMER et al., 2005). Difere da necrose, morte celular desorganizada que envolve ruptura da membrana plasmática e dilatação das organelas citoplasmáticas (OKADA; MAK, 2004; KROEMER et al., 2005; ZONG; THOMPSON, 2006).

Tipos específicos de morte celular podem ocorrer no sistema nervoso, como a excitotoxicidade e a degeneração walleriana. A primeira é desencadeada por aminoácidos excitatórios, tais como o glutamato, que abrem canais de cálcio, com

conseqüente aumento do cálcio citossólico e morte; e a segunda, envolve degeneração parcial de axônios ou neurônios. Na epiderme, a cornificação, ou também denominada queratinização, caracteriza um tipo muito específico de PCD, com formação do corneócito, que confere resistência à pele (KROEMER et al., 2005; ZONG; THOMPSON, 2006).

A apoptose, a mais bem definida PCD, constitui evento fisiológico organizado, essencial para a manutenção da homeostase, envolvendo redução do volume celular, fragmentação do núcleo e formação de corpúsculos apoptóticos (CA) (OKADA; MAK, 2004; KROEMER et al., 2005). A ocorrência de um estímulo apoptótico durante a mitose pode levar a célula à mitose catastrófica, um tipo de morte que se assemelha bioquimicamente à apoptose, mas que pode ser desencadeada também por uma falha durante, ou logo após o processo mitótico (CASTEDO et al., 2004; KROEMER et al., 2005). A perda da correta posição da célula no estroma, pode desencadear outro tipo de morte, similar à apoptose, denominada anoikis (GILMORE, 2005).

É provável que a carcinogênese dependa do balanço entre os danos ao DNA, a efetividade do reparo, a proliferação celular, a apoptose e da resposta aos estímulos do microambiente (COATES; LORIMORE; WRIGHT, 2005; JING; NAN; HU, 2005; KALLURI; ZEISBERG, 2006). Dessa forma, a apoptose exerce relevante papel quando o mecanismo de reparo do DNA não é suficiente para evitar o dano genético. Assim, a célula mutada pode ser eliminada do organismo por esse tipo de morte, que representa um mecanismo de proteção contra a transformação e desenvolvimento da neoplasia, e elimina células com dano genético ou que não respondem aos estímulos proliferativos (HENGARTNER, 2000; KONG et al., 2001).

Duas vias alternativas que iniciam a apoptose: a via extrínseca, mediada por receptores de morte presentes na membrana plasmática; e a via intrínseca, associada com o aumento da permeabilidade mitocondrial. Em ambas, descreve-se que há ativação de proteases específicas, as caspases, responsáveis pela quebra do substrato celular (IGNEY; KRAMMER, 2002).

Mais especificamente, as células apoptóticas inicialmente se retraem e se tornam densas. Há perda de água no interior do retículo endoplasmático, resultando em dilatação das suas cisternas. No núcleo, a cromatina apresenta-se condensada à membrana nuclear. O núcleo também pode se fragmentar. Os CA então formados contêm freqüentemente fragmentos de cromatina condensada que subseqüentemente podem ser fagocitados pelos macrófagos ou células vizinhas, sendo assim digeridos pelos lisossomos celulares. Células ou CA não atraem neutrófilos e linfócitos, relacionados mais especificamente às respostas inflamatórias. Portanto, para o organismo como um todo, a apoptose constitui um processo pelo qual as células com danos não reparados, ou não necessárias, podem ser removidas rapidamente (GOLDSWORTHY; FRANSSON-STEEN; MARONPOT, 1996; SCHULTE-HERMANN et al., 1997; RUST; GORES, 2000).

A indução da apoptose é controlada por diversas vias, uma das quais a proteína p53 tem um papel relevante. Além dessa função, a p53 possui outras múltiplas atribuições, pois está também envolvida com bloqueio do ciclo celular, senescência, diferenciação e reparo celular. Grande parte das ações da p53 está associada ao seu caráter como fator de transcrição (HOFSETH; HUSSAIN; HARRIS, 2004).

No entanto, a mutação constitui a causa da inativação desse gene supressor de tumor em cerca de 50% dos cânceres, e ocorre principalmente na região de

ligação ao DNA (VOUSDEN, 2002; YU; ZHANG, 2005). É freqüentemente encontrada em câncer de mama, cólon, pulmão, bexiga e fígado, geralmente associada a um mau prognóstico (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2002). Porém, mesmo na ausência da mutação, descreve-se que na maioria dos cânceres a p53 está com sua atividade prejudicada (WESIERSKA-GADEK; HORKY, 2003).

Assim, a inativação pode ser ocasionada por modificações em genes cujos produtos interagem com a p53 (PRIVES; HALL, 1999; VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000), ou por alterações no controle da transcrição e tradução do seu gene, bem como por modificações epigenéticas (VOUSDEN, 2002).

Em condições normais, a p53 é mantida em níveis nucleares não-detectáveis, por meio de degradação constitutiva (FABBRO; HENDERSON, 2003). Em resposta ao estresse genotóxico, há fosforilação da p53, que pode aumentar sua estabilidade. Esse evento pode ocorrer por duas vias: uma delas em resposta à inibição da ligação da p53 fosforilada com a proteína MDM2, esta responsável pelo recrutamento do sistema proteassomo de degradação, pela ubiquitinação da p53; e a outra via, relacionada com a inibição da exportação da p53 fosforilada para o citoplasma. No entanto, há outras formas de estabilização da p53, independente da sua fosforilação (VOUSDEN, 2002), como a ação de uma proteína que coopera com a atividade de HAT, a ZBP-89, que também inibe a exportação da p53 para o citoplasma (BAI; MERCHANT, 2001).

Assim, quando translocada para o núcleo, a p53 forma um complexo tetramérico, sua forma ativa (PRIVES; HALL, 1999). Como fator de transcrição, essa proteína liga-se a um sítio presente em seqüências regulatórias de genes p53-dependentes, relacionados com o bloqueio do ciclo celular, reparo dos danos ao

DNA, indução da apoptose, e outros genes (FABBRO; HENDERSON, 2003), que o caracterizam como guardião do genoma (HOFSETH; HUSSAIN; HARRIS, 2004).

A atividade da p53 pode ser regulada não só pela localização nuclear, pois apesar desta proteína no citoplasma ser freqüentemente associada com sua degradação, há relatos a respeito da atividade da p53 na mitocôndria para induzir apoptose (MOLL et al., 2005). No entanto, sabe-se que essa atividade citoplasmática da p53 é secundária a sua ação no núcleo (VOUSDEN, 2002). Nesse sentido, a falha da localização nuclear da p53 é a causa da sua inativação em diversas neoplasias (SENGUPTA et al., 2000).

A atividade da p53 pode ser regulada também por outras modificações pós-traducionais, tais como a acetilação. Descreve-se que a acetilação da p53 aumenta sua ligação ao DNA (LUO et al., 2004). Essa modificação, catalisada por uma HAT com atividade de acetiltransferase de fator de transcrição (FAT), neutraliza a carga positiva da lisina da região carboxi-terminal da p53 e expõe a região de ligação ao DNA (GU; ROEDER, 1997).

Assim, uma vez ativada em resposta a danos ao DNA, ou outras injúrias celulares, a p53 pode induzir tanto a apoptose, como causar a parada do ciclo celular, dependendo da situação. Descreve-se que em casos onde a indução de genes pró-apoptóticos não é suficiente para engatilhar o processo de morte, a p53 leva ao bloqueio do ciclo celular como meio indireto para induzir a apoptose (YU; ZHANG, 2005).

Um dos primeiros efeitos descritos a respeito da expressão de p53 é a inibição do ciclo celular, uma vez que a p53 regula a expressão de diversos genes envolvidos com o bloqueio da proliferação celular, tanto na transição G1/S, quanto na G2/M do ciclo celular (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000).

Apesar dos mecanismos ainda não serem totalmente conhecidos, a p53 está envolvida tanto com a via intrínseca como a extrínseca da apoptose (HOFSETH; HUSSAIN; HARRIS, 2004). Na via intrínseca, por induzir a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como alguns membros da família Bcl-2. Já na via extrínseca, atua na ativação de receptores de morte da membrana plasmática (YU; ZHANG, 2005). Descreve-se ainda que a p53 pode interagir diretamente com a mitocôndria, estimulando-a a produzir um excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS), que também pode levar à morte celular (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000).

Pertencente ao mesmo ancestral de fatores de transcrição da p53 (DREYFUS et al., 2005), o fator nuclear- κ B (NF- κ B) refere-se a uma família de dímeros formados por várias proteínas (NAKANISHI; TOI, 2005). Devido ao caráter divergente destes dois fatores de transcrição, Webster e Perkins (1999) relataram que tanto o NF- κ B pode modular a ativação da p53, quanto esta pode suprimir a atividade transcricional do NF- κ B, e assim, por meio deste tipo de interação a célula pode controlar mecanismos tão distintos.

Com relação ao NF- κ B, os diferentes heterodímeros que integram essa família atuam como fatores de transcrição de uma variedade de genes envolvidos com inflamação, imunidade, morte e reparo celular (NAKANISHI; TOI, 2005). Nos mamíferos, há 5 membros conhecidos da família NF- κ B: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (RelA), c-Rel e RelB.

Fatores de crescimento, citocinas, hormônios e outros sinais, como o estresse celular, ativam o NF- κ B (NAKANISHI; TOI, 2005). Assim, há liberação do heterodímero p65/p50, forma mais comum do NF- κ B, pela fosforilação e conseqüente degradação do seu principal inibidor I κ B α (QUIVY; LINT, 2004; NAKANISHI; TOI, 2005). Liberado no citoplasma, esse heterodímero pode ser

translocado para o núcleo, onde somente a fração p65 apresenta o domínio de transativação para desempenhar a função como fator de transcrição (ZHONG et al., 2002). Nesse sentido, a presença de p65 no núcleo foi atribuída como forma de avaliação da ativação do NF- κ B (CARRASCO-LEGLEU et al., 2004; ESPÍNDOLA et al., 2005; MAZZANTINI, 2005).

Em células não estimuladas, NF- κ B é seqüestrado para o citoplasma sob uma forma inativa, pela interação com uma proteína inibitória κ B (I κ B), que inclui: I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ , das quais a mais estudada é a I κ B α . Assim, para exercer suas funções no núcleo, o NF- κ B deve ser liberado do complexo com seu inibidor I κ B no citoplasma. Uma das formas de liberação é pela degradação de I κ B α , que pode ocorrer via fosforilação mediada por um complexo quinase citoplasmático (IKK), que marca I κ B α para poliubiquitinação e degradação pelo sistema proteassomo. Assim, essa degradação possibilita uma rápida translocação do NF- κ B para o núcleo, onde ele ativa a transcrição de diversos genes, incluindo de seu próprio inibidor (QUIVY; LINT, 2004). No entanto, esse fator de transcrição está sujeito a uma variedade de modificações pós-traducionais que controlam a duração e sua atividade no núcleo (CHEN; GREENE, 2004). Zhong et al. (2002) demonstraram que ao ser liberado do citoplasma, o dímero p50/p65 é fosforilado, permitindo sua ligação ao complexo coativador CBP/p300 no núcleo para ativar a transcrição gênica.

Além disso, existem duas classes distintas de genes que podem ser ativados por NF- κ B: os constitutivamente e imediatamente acessíveis a esse fator de transcrição e os que necessitam de modificações conformacionais, ocasionadas pela hiperacetilação de histonas, para se tornarem acessíveis ao NF- κ B (SACCANI; PÂNTANO; NATOLI, 2001; QUIVY; LINT, 2004). Diversos autores observaram que a acetilação de diferentes resíduos de lisina em p50 e p65 regulam diferentes funções

do NF- κ B, incluindo a ativação transcricional, afinidade de ligação ao DNA e associação à I κ B α (CHEN et al., 2001; CHEN; MU; GREENE, 2002; KIERNAN et al., 2003).

Ao exercer sua atividade, NF- κ B promove a transcrição de genes envolvidos com a apoptose. Apesar de haver algumas descrições a respeito de sua ação pró-apoptótica, NF- κ B caracteriza-se principalmente por inibir este tipo de morte celular programada. Desta forma, evidências sugerem que a atividade anti-apoptótica do NF- κ B é requerida em evento precoce da transformação maligna (LIN; KARIN, 2003), inclusive em fase de LPN na hepatocarcinogênese em ratos (CARRASCO-LEGLEU et al., 2004; ESPÍNDOLA et al., 2005; MAZZANTINI, 2005) e no hepatocarcinoma humano (LIU et al., 2002).

Mutações no gene que codifica para I κ B α foram detectadas em linfoma de Hodgkin, o que contribuiu para um aumento da atividade constitutiva de NF- κ B (CABANNES et al., 1999). Em diversas linhagens de células de carcinoma de tireóide humana, a atividade de NF- κ B e o nível de expressão da subunidade p65 apresentaram-se elevados, sugerindo que este fator de transcrição possa ser um componente importante para a transformação celular (VISCONTI et al., 1997). Mudanças fenotípicas observadas em células humanas de câncer de mama em estágio avançado, com características como alta capacidade invasiva e de metastatização; e resistência à quimioterapia, foram associadas à maior degradação, ou menor nível de I κ B α e I κ B β (NEWTON et al., 1999). Esse quadro levou à atividade constitutiva de NF- κ B, que resultou, possivelmente, na perda de receptores funcionais para estrógeno (NAKSHATRI et al., 1997).

1.2 Hepatocarcinogênese e modelo do “Hepatócito Resistente” (RH)

Como 3ª causa mais comum de morte devido ao câncer primário, destaca-se o hepatocarcinoma, 15ª neoplasia com maior incidência no mundo (PARKIN et al., 2001 apud LLOVET; BURROUGHS; BRUIX, 2003). Com crescimento considerável na incidência global nos últimos anos, o hepatocarcinoma tornou-se uma das mais freqüentes neoplasias malignas (EMANUELE et al, 2004). Dentre os fatores de risco desse tipo de câncer, cerca de 80% originam-se a partir da cirrose, ou como resultado de infecções virais crônicas, tais como hepatite B (HBV) e C (HCV) (LLOVET; BURROUGHS; BRUIX, 2003), e até mesmo do consumo excessivo de bebidas alcoólicas e cigarros, reduzido consumo de frutas e hortaliças, ingestão de arsênico inorgânico, exposição à aflatoxina B1 e sobrecarga de ferro (CHEN; YU; LIAW, 1997).

O padrão de desenvolvimento da neoplasia maligna do fígado em ratos é semelhante ao que se observa em seres humanos (FARBER; SARMA, 1987; SU et al., 1997; BANNASCH; HAERTEL; SU, 2003; SU; BANNASCH, 2003). Além disso, modelos de hepatocarcinogênese química em ratos foram reconhecidos e são recomendados pela International Life Sciences Institute (ILSI) para testes de substâncias carcinogênicas ou estudos de quimioprevenção (ITO; TAMANO; SHIRAI, 2003).

Diversos modelos foram descritos para o estudo da hepatocarcinogênese química. A maior parte utiliza um carcinogênico genotóxico como agente iniciador,

sendo as nitrosaminas, micotoxinas ou aminas aromáticas, os compostos mais usados. Além disso, em vários protocolos a primeira fase da evolução dos hepatócitos já iniciados é estimulada por breve ou prolongada exposição a um ambiente que selecione estas células para um crescimento diferenciado (promoção) (FARBER; SARMA, 1987; MANJESHWAR et al., 1999).

Os modelos experimentais de hepatocarcinogênese são caracterizados por apresentarem proliferações de hepatócitos considerados ainda pré-neoplásicos, antes do surgimento do hepatocarcinoma, pois não parecem ter nenhum grau de crescimento autônomo, designado por focos e nódulos de hepatócitos. Por convenção, denominam-se focos de hepatócitos às lesões menores do que um lóbulo hepático, enquanto o termo nódulos de hepatócitos é aplicável a lesões geralmente esféricas, ocupando área equivalente a um ou vários lóbulos hepáticos (BANNASCH; ZERBAN, 1990).

De acordo com critérios morfológicos e citoquímicos, os focos de hepatócitos podem ser classificados em: claros, acidofílicos, vacuolizados, intermediários, mistos, basofílicos, tigróides e anfofílicos (BANNASCH; ZERBAN, 1990). Estes representariam, com exceção dos tigróides e anfofílicos, etapas sucessivas de uma seqüência ordenada de alterações celulares. Essa seqüência progride de focos predominantemente com células claras ricas em glicogênio ou acidofílicas, para focos de hepatócitos com populações celulares intermediárias mistas e basofílicas, culminando em nódulos (adenomas) e carcinomas hepatocelulares (ZERBAN et al., 1994; SU et al., 1997; SU; BANNASCH, 2003).

Além disso, essas LPN hepáticas podem ser distinguidas do tecido não-transformado ao seu redor, por alterações nas expressões de várias enzimas incluindo a adenosina trifosfatase (ATPase), glicose-6-fosfatase, γ -

glutamyltranspeptidase (γ GT) e glutathione S-transferase forma placentária (GST-P), que comumente são utilizadas como marcadores para suas identificações, bem como para a avaliação de seus números e dimensões por meio de análise de imagem computadorizada (FARBER; SARMA, 1987; BANNASCH; ZERBAN, 1990; DRAGAN et al., 1997; IMAI et al., 1997; ITO et al., 2000; ITTRICH et al., 2003).

Apesar de produzirem muitas vezes elevada incidência de neoplasias malignas, nem todos os modelos de hepatocarcinogênese, entretanto, são úteis à avaliação do processo carcinogênico, justamente por não resultarem em sincronização do aparecimento das lesões precursoras. Essa sincronia tem grande importância, pois a análise seqüencial de qualquer processo em múltiplas etapas, seja ela molecular, bioquímica, genética ou biológica, necessita de um sistema sincronizado; caso exista a intenção de se estabelecer uma relação precursor-produto em cada uma das principais etapas (FARBER, 1995).

Dentre os vários protocolos de hepatocarcinogênese existentes para ratos, 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) é adequado para induzir elevada incidência de cânceres e avaliar e comparar efeitos de substâncias capazes de modular o processo carcinogênico (FARBER; SARMA, 1987; RIZZI et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2001; CARRASCO-LEGLEU et al., 2004).

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

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

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

O AAF é capaz de inibir a proliferação da maior parte dos hepatócitos normais, ou seja, dos não iniciados (sensíveis), mas não a proliferação dos poucos hepatócitos resistentes (FARBER, 1995) que apresentam, caracteristicamente, atividades das enzimas das fases I e II responsáveis pela metabolização de xenobióticos, diminuídas e aumentadas, respectivamente (ROOMI et al., 1985).

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 nódulos precoces já podem ser observados

macroscopicamente em uma ou duas semanas após a etapa de seleção/promoção inicial (SOLT; FARBER, 1976; FARBER; SARMA, 1987).

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

Demonstrou-se que nódulos persistentes de hepatócitos claramente atuam como sede de futura evolução para o câncer. Assim, nódulos persistentes são facilmente observáveis ao redor de 7 meses após aplicação do agente iniciante, a DEN. Esses nódulos apresentam seqüência progressiva de evolução celular, com a ocorrência de “nódulos em nódulos” e, finalmente, aparecimento de câncer após cerca de 10-11 meses (FARBER; SARMA, 1987).

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

Portanto, a maior parte dos nódulos persistentes tem o mesmo padrão de remodelação que a maioria dos nódulos, embora muito mais lento, não existindo evidências de que nódulos que se remodelam e aqueles que persistem representem,

na verdade, duas respostas inteiramente diferentes à ação de carcinogênicos (FARBER, 1990).

Assim, diversas observações demonstram a existência de uma relação evolutiva entre focos e nódulos de hepatócitos e cânceres hepáticos (FARBER; SARMA, 1987; SU et al., 1997), como por exemplo, a presença de associação topográfica entre as várias lesões (WILLIAMS, 1980; FARBER, 1990), e o fato de que, ao contrário do fígado normal, mas de forma semelhante a diversos hepatocarcinomas testados, nódulos hepáticos, na proporção de 1/3, contêm hepatócitos que expressam capacidade de invasão em ensaio in vitro (FARBER; SARMA, 1987). Da mesma forma, experimentos já mais recentes em que se utilizou marcação genética de hepatócitos também proporcionaram evidência definitiva quanto à origem clonal do hepatocarcinoma a partir de hepatócitos maduros, em modelo de carcinogênese em ratos induzida pela DEN (BRALET; PICHARD; FERRY, 2002).

1.3 Quimioprevenção do câncer

Devido à complexidade, alta mortalidade e crescente incidência de câncer no mundo, a prevenção é o método mais adequado para o controle dessa doença (SPORN; SUH, 2002).

Nas décadas de 60 e 70, surgiam indícios de que o câncer estava relacionado a fatores ambientais, e que, portanto, poderia ser prevenido. Nessa época, diversos epidemiologistas observaram os efeitos da imigração e das mudanças de hábito nas

populações, juntamente com modificações nos tipos de câncer (revisado por ALCANTARA; SPECKMANN, 2006).

Desse modo, em 1981, Doll e Peto publicaram uma importante revisão, relatando que o câncer era passível de prevenção ao observar que as diferentes taxas de incidência de câncer entre os países poderiam ser atribuídas, em parte, aos fatores ambientais e ao estilo de vida, como fumo, comportamento reprodutivo, exposição ocupacional a carcinógenos e alimentação.

Em 1997, a American Institute of Cancer Research (AICR) e a World Cancer Research Foundation (WCRF) chegaram a um consenso científico sobre a prevenção do câncer, reafirmando as observações de Doll e Peto (1981).

De Flora e Ferguson (2005) discorreram sobre as 3 formas para se prevenir o câncer: a prevenção primária, aplicada a indivíduos saudáveis e que, inclui portanto, a inibição da iniciação e promoção; a prevenção secundária, direcionada a pacientes em estágios precoces da doença, podendo inibir a etapa de conversão da neoplasia benigna em maligna; e a prevenção terciária, com a qual se evitam metástases ou recidivas do câncer.

Em vista disso, o mais adequado seria o bloqueio dos agentes etiológicos, ou seja, a prevenção primária do câncer (SPORN; LIBY, 2005), possível apenas em alguns casos, como por exemplo, em relação ao fumar (VINEIS et al., 2004) ou na aplicação de vacinas contra alguns tipos de câncer (LOLLINI et al., 2006). Porém, na maior parte das situações esse objetivo torna-se inviável, já que estamos constantemente expostos a uma mistura de agentes que podem agir em diferentes estágios da carcinogênese (HURSTING et al., 1999) e, além disso, mais de 50% das causas de neoplasias malignas humanas são ainda desconhecidas (WATTENBERG, 1997).

Porém, Doll e Peto (1981) já haviam concluído que modificações na alimentação poderiam reduzir em 35% a mortalidade por câncer nos Estados Unidos (com uma variação de 10 a 70%). Assim, após revisão e análise de todos esses dados reunidos, referentes à dieta, nutrição e câncer acumulados na literatura, diversos pesquisadores e consultores de diferentes países publicaram, dentre outras conclusões, a seguinte recomendação: “que se deve reconhecer, inclusive as autoridades governamentais competentes, que a incidência de câncer no mundo pode ser reduzida em 30-40%, através de alterações adequadas na alimentação e em determinados estilos de vida” (WCRF/AICR, 1997).

Diversos estudos epidemiológicos ou com animais já enfocaram a relação direta entre dieta e câncer de pulmão, cólon, mama, próstata, estômago, bexiga, entre outros (AICR/WCRF, 1997; KELLOFF et al., 2000; FORMAN et al., 2004), sendo que o consumo de frutas, hortaliças e fibras revelaram ter um efeito protetor (DOLL, 1990; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; ALCANTARA; SPECKMANN, 2006); ao contrário da ingestão de gordura e carne vermelha (BIRT, 1987; DOLL, 1990). Esse efeito protetor se deve principalmente à ação dos compostos bioativos presentes nesses alimentos (DAVIS; MILNER, 2004).

Nesse sentido, insere-se o conceito da quimioprevenção, relatado pela primeira vez por Sporn et al. (1976). Segundo Wattenberg (1997), a quimioprevenção é o método mais apropriado para se evitar o câncer e consiste na prevenção, inibição ou reversão das etapas iniciais da carcinogênese, ou seja, antes da progressão, pela administração de um ou mais compostos químicos sintéticos ou naturais (STONER; MORSE; KELLOFF, 1997).

Assim, diversos compostos bioativos presentes em alimentos apresentam atividade quimiopreventiva (DAVIS; MILNER, 2004). Derivados isoprênicos,

retinóides e análogos mostraram efeito protetor em LPN hepáticas de ratos (TOLEDO et al., 2003; ESPÍNDOLA et al., 2005; FONSECA et al., 2005; ONG et al., 2006), e em outros tipos de neoplasias (SURH, 2003; FORMAN et al., 2004).

Vale ressaltar que a atividade quimiopreventiva de certos compostos em modelos experimentais com animais é essencial para que se prossiga com ensaios clínicos (SPORN; SUH, 2002). Portanto, a busca de mecanismos que elucidem a influência dos alimentos no câncer contribui para esclarecer aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, além de promover um grande impacto em estratégias de prevenção (AMES; GOLD; WILLETT, 1995).

1.4 Ácido butírico e tributirina

O ácido butírico (AB) é um ácido graxo de cadeia curta (AGCC), formado por quatro carbonos. É obtido principalmente pela fermentação de fibras alimentares na microflora gastrintestinal (WATKINS et al., 1999), mas pode ser encontrado também na saliva (JENG et al., 2006) e pela digestão de dibutilglicerol e tributilglicerol, presentes na gordura do leite (LAI et al., 1997; PARODI, 1997). O AB é encontrado também, em menor quantidade, no mel (NOZAL et al, 2003).

Como boa fonte para obtenção do AB, a fermentação de fibras alimentares ocorre principalmente no ceco e cólon em não-ruminantes, em uma proporção considerada elevada (FITCH; FLEMING, 1999). Estima-se que em humanos a maior taxa de fermentação ocorra no cólon, e que 83% do total de AGCC produzidos por

essa fermentação são constituídos por acetato, propionato e butirato, na proporção de 60:25:15 (CUMMINGS et al., 1987).

Independentemente da forma de obtenção, o AB é absorvido pelo intestino delgado ou grosso, com igual eficiência, por difusão passiva ou por bomba de $\text{HCO}_3^-/\text{H}^+$ (CUMMINGS, 1981). Vale ressaltar que a taxa de absorção do AB, mais eficiente em ratos jovens, aumenta proporcionalmente com a concentração desse AGCC no intestino (FITCH; FLEMING, 1999). Dessa forma, estudos com dietas com reduzido conteúdo de fibras, geraram baixas concentrações de AB no ceco e cólon de ratos, com valores entre 3 e 5 mM (HENNINGSSON; BJÖRCK; NYMAN, 2002), que podem ser elevados a 40 mM com a ingestão de elevado teor de fibras fermentáveis (CHENG et al., 1987). Nesse último caso, a concentração de AB nos não-ruminantes atinge concentração equivalente à do rúmen (20 mM butirato) (CUMMINGS, 1981).

Após a etapa de absorção intestinal, uma parte do AB resulta em corpos cetônicos, principalmente 3-hidroxibutirato (FITCH; FLEMING, 1999), e outra parte é metabolizada a butiril-CoA, enoil-CoA, L-hidroxiacil-CoA, acetoacetil-CoA e acetil-CoA, este último para ser utilizado como energia (LESCHELLE et al., 2000). No cólon, esse AGCC constitui o principal combustível dos colonócitos, representando 70% da energia consumida por estas células (SCHEPPACH et al., 1992) e desempenhando, portanto, papel essencial no desenvolvimento normal desse órgão (WATKINS et al., 1999).

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

Em células neoplásicas, poucos são os estudos a respeito do metabolismo do AB, sendo a maioria desenvolvida *in vitro*. Leschelle et al. (2000) demonstraram que células de adenocarcinoma de cólon humano apresentaram metabolismo semelhante ao do colonócito normal, capaz de acumular e oxidar o AB, com formação de corpos cetônicos, porém, em menores quantidades.

Essas observações, no entanto, foram diferentes de estudo *in vivo* com o AB. Zhang et al. (1998) compararam o metabolismo de colonócitos normais e neoplásicos de ratos em dietas com elevado teor de fibras e verificaram que nos animais submetidos a modelo de carcinogênese, as células com maior índice proliferativo possuíam menor quantidade de mitocôndrias que células normais, que implicou menor oxidação do butirato e produção de corpos cetônicos.

Descreve-se que grande parte das ações anticarcinogênicas do AB está relacionada a sua atuação como inibidor da enzima desacetilase de histonas (HDACi). A inibição das HDAC promove um estado de hiperacetilação de histonas e de proteínas não-histonas, modulando a transcrição de vários genes (DRUMMOND et al., 2005).

Entre os AGCC, o AB apresenta a maior ação na inibição da carcinogênese (HAGUE; BUTT; PARASKEVA, 1996; VECCHIA et al., 1997), demonstrada em estudos conduzidos grande parte *in vitro*. Dessa atividade anticarcinogênica do AB, ressaltam-se suas propriedades antiinflamatórias, de melhora da resposta imune, de bloqueio do ciclo celular, de indução da apoptose e da diferenciação celular, de diminuição da angiogênese em diversas linhagens de células neoplásicas (WILLIAMS; COXHEAD; MATHERS, 2003; DRUMMOND et al., 2005) e de redução de metástase em células de fibrossarcoma (ZENG; BRISKE-ANDERSON, 2005).

Assim, com relação à atividade antiinflamatória do AB, é possível dizer que a diminuição do metabolismo deste AGCC resulta em numerosos danos aos colonócitos (KINOSHITA; SUZUKI; SAITO, 2002). Todas essas mudanças culminam em uma integridade epitelial prejudicada, com conseqüente aumento da permeabilidade celular, facilitando processos inflamatórios locais (GIBSON, 2000). Nesse sentido, a administração do AB diminuiu a permeabilidade celular e a inflamação em cultura de células de carcinoma de cólon humano (KINOSHITA; SUZUKI; SAITO, 2002). Esse efeito foi relacionado à inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias nos colonócitos (WILLIAMS; COXHEAD; MATHERS, 2003).

A indução da diferenciação pelo AB, descrita por diversos autores como uma das suas propriedades anticarcinogênicas (DRUMMOND et al., 2005), foi observada em linhagens de câncer de cólon (HEERDT; HOUSTON; AUGENLICHT, 1994; KINOSHITA; SUZUKI; SAITO, 2002; ORCHEL et al., 2005), de carcinoma de pâncreas, de leucemia, entre outras (WITT et al., 2001).

O mecanismo pelo qual o AB leva células à diferenciação não é totalmente conhecido, mas a modulação da expressão gênica devido à hiperacetilação de histonas é uma hipótese sugerida por alguns autores (CONLEY et al., 1998).

Há pelo menos 2 décadas estabeleceu-se que o butirato, em concentrações milimolares, inibe a proliferação de diversos tipos de linhagens celulares (KRUH, 1982; WINTERSBERGER; MUDRAK; WINTERSBERGER, 1983). Posteriormente, outros autores também demonstraram ação antiproliferativa do AB em cultura de adenocarcinoma de cólon (NAKANO et al., 1997; KINOSHITA; SUZUKI; SAITO, 2002; CHEN et al., 2004), hepatocarcinoma (SAITO et al., 1998; YAMAMOTO et al., 1998), leucemia, adenocarcinoma de cérvix uterina, câncer de mama,

osteossarcoma e carcinoma de pulmão (VECCHIA et al., 1997; GÀLFI; NEOGRÀDY; CSORDÁS, 2002; MUNSHI et al., 2005).

Demonstrou-se em cultura de células de adenocarcinoma de cólon que o mecanismo de bloqueio do ciclo celular por parte do AB é anterior a sua metabolização à acetil-CoA, o que significa que provavelmente a ação antiproliferativa é intrínseca à própria molécula do AB (LESCHELLE et al., 2000).

Vale ressaltar que na administração do AB a várias linhagens de células transformadas, as gastrintestinais foram mais susceptíveis à inibição da proliferação celular do que as linhagens não-gastrintestinais (GÀLFI; NEOGRÀDY; CSORDÁS, 2002).

Em geral, o AB causa bloqueio do ciclo celular em G1/S, mas ocasionalmente esse pode ocorrer em G2/S (SAITO et al., 1998). Em diversas linhagens de células neoplásicas, Joseph, Wajapeyee e Somasundaram (2005) atribuíram o bloqueio em G1/S à ausência da p53 e em G2/M, à presença desta proteína. Nesse último caso, demonstraram, ainda, que a inibição da proliferação celular pelo AB estava relacionada à acetilação da p53. Essa modificação, com conseqüente ativação da p53, também foi observada em cultura de células de melanoma por Bandyopadhyay, Mishra e Medrano (2004).

Outros estudos, no entanto, demonstraram que o efeito inibitório do AB no ciclo celular estava ligado principalmente ao aumento da expressão de p21^{WAF1/CIP1}, mas de maneira independente da p53 em células de hepatocarcinoma, adenoma e carcinoma de cólon (NAKANO et al., 1997; SAITO et al., 1998; YAMAMOTO et al., 1998; KOBAYASHI; TAN; FLEMING, 2003) e melanoma (MUNSHI et al., 2005).

Descreve-se que o AB é um potente indutor de apoptose em diversos tipos de cultura de células (WILLIAMS; COXHEAD; MATHERS, 2003), com maior atuação

em linhagens gastrintestinais (GÀLFI; NEOGRÁDY; CSORDÁS, 2002). Porém, o mecanismo pelo qual o AB leva células à morte celular programada não é totalmente compreendido (JOSEPH; WAJAPYEYEE; SOMASUNDARAM, 2005).

Vários estudos indicam a atuação do AB tanto na via intrínseca, associada com o aumento da permeabilidade mitocondrial, quanto na via extrínseca de indução da apoptose, ativada por receptores de morte na membrana plasmática (IGNEY; KRAMMER, 2002). Emanuele et al. (2004) observaram ativação da via mitocondrial em células de hepatocarcinoma tratadas com AB. Outros autores mostraram a indução da apoptose pelo AB associada à via extrínseca em células de hepatocarcinoma (OGAWA et al., 2004) e de carcinoma de cólon (HERNANDEZ et al, 2001).

Além disso, os estudos demonstraram que o AB causou aumento de expressão de proteínas pró-apoptóticas em cultura de células de hepatocarcinoma (SAITO et al., 1998; EMANUELE et al., 2004), melanoma (BANDYOPADHYAY; MISHRA; MEDRANO, 2004) e no cólon, nas linhagens de adenoma, mas não nas de carcinoma (HAGUE et al., 1997).

No entanto, há controversas em relação à ação indutora de apoptose do AB estar relacionada ao aumento da atividade ou nível da proteína p53, uma das mais potentes moléculas pró-apoptóticas (TERUI et al., 2003). Em linhagem de células de câncer de próstata, alguns autores atribuíram que o mecanismo de indução da apoptose por parte do AB foi independente da p53 (KUEFER et al., 2004), mas que pode ser dependente na presença de p53 não-mutado. Além disso, alguns autores associaram o tratamento de vários tipos de células neoplásicas com o AB à acetilação da p53, que causou maior estabilização desta proteína. Assim, concluíram que esse mecanismo seria o responsável pelo recrutamento de outras proteínas pró-

apoptóticas (TERUI et al., 2003; BANDYOPADHYAY; MISHRA; MEDRANO, 2004; JOSEPH; WAJAPYEYEE; SOMASUNDARAM, 2005).

Dentre as diversas propriedades do AB, há de se considerar sua capacidade de modular a ativação e a atividade do fator de transcrição NF- κ B (PLACE; NOONAN; GIARDINA, 2005). No entanto, não há um consenso a respeito da modulação desse fator de transcrição por parte do AB. Alguns trabalhos enfocam a ação do AB na acetilação de histonas, de modo a favorecer o acesso de fatores de transcrição ao DNA, assim como discorrem a respeito da influência dessa substância na acetilação dos dímeros que compõem o NF- κ B.

Assim, estudos demonstraram que o tratamento com o AB aumenta a ativação, a atividade e a transcrição dependente de NF- κ B (ADAM et al., 2003; MAYO et al., 2003; GAO et al., 2004), que resultou em inibição da apoptose em diversos tipos de cultura de célula (MAYO et al., 2003; GAO et al., 2004). Em outros estudos, no entanto, observou-se que em linhagens celulares de câncer de cólon, o AB inibiu a atividade do NF- κ B (YIN; LAEVSKY; GIARDINA, 2001; PLACE; NOONAN; GIARDINA, 2005).

Porém, apesar do AB ser considerado um quimiopreventivo promissor (DRUMMOND et al., 2005), na utilização de um modelo in vivo, deve-se considerar a farmacocinética da substância a ser testada.

Assim, a utilização do AB como agente quimiopreventivo é dificultada devido a sua meia-vida plasmática curta, de aproximadamente 6 minutos (DANIEL et al., 1989). Tal situação pode ser contornada pela administração contínua das suas formas de sal, como butirato de sódio ou de arginina. Porém, essa conduta potencializa efeitos adversos inerentes aos sais e são dispendiosos (SHER et al., 1995; CONLEY et al., 1998). Dessa forma, torna-se favorável a utilização de pró-

fármaco do AB, a tributirina (T). Essa substância apresenta meia-vida mais prolongada que seu produto AB e pode ser incorporada em emulsões ou cápsulas, de modo a facilitar sua administração oral e o uso em longo prazo (CONLEY et al., 1998; WATKINS et al., 1999; EDELMAN et al., 2003).

A T é um triacilglicerol que contém três moléculas de AB esterificadas com o glicerol (**Figura 2**), e está presente no leite e seus derivados (LAI et al., 1997; PARODI, 1997). Além disso, a T é um líquido que pode ser administrado oralmente, liberando AB quando hidrolisada pela lipase pancreática, e possivelmente por outras enzimas, alcançando substancial concentração plasmática de AB por várias horas (EGORIN et al., 1999).

Figura 2. Esquematização da hidrólise de uma molécula de tributirina pela lipase pancreática para dar origem a 3 moléculas de AB.

Com relação às propriedades anticarcinogênicas da T, demonstrou-se que o tratamento com essa substância causou bloqueio da proliferação e indução da apoptose de um maior número de células, quando comparado à administração, em

concentração equimolar, de AB, em linhagem de câncer de próstata (KUEFER et al., 2004). A aplicação da T mostrou ser eficiente também na indução da apoptose em linhagem de hepatocarcinoma (WATKINS et al., 1999) e de câncer de mama (HEERDT et al., 1999).

Com relação à indução da diferenciação celular, o tratamento com a T mostrou ser 3 vezes mais potente que a administração do AB em linhagem de leucemia (CHEN; BREITMAN, 1994). Outros estudos demonstraram a indução da diferenciação pelo tratamento de linhagens de câncer de cólon e próstata, este último associado ao aumento da expressão de diversos genes (SCHRÖDER; MAURER, 2002; FLORYK; HUBERMAN, 2005).

Assim, com base nos estudos que demonstraram diversas ações anticarcinogênicas da T, gerou-se a hipótese inédita e in vivo de que essa substância possa exercer atividade quimiopreventiva na hepatocarcinogênese experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a eventual atividade quimiopreventiva da T, quando administrada em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção, em ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” (RH).

2.2 Específicos

- Quantificar macroscopicamente LPN nos fígados de ratos Wistar tratados ou não com T, continuamente, durante as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do RH;
- Quantificar microscopicamente LPN nos fígados de ratos Wistar tratados ou não com T, continuamente, durante as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do RH
- Avaliar histopatologicamente as LPN e a presença de células ovais nos fígados de ratos Wistar tratados ou não com T, continuamente, durante as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do RH;
- Quantificar a proliferação celular nos fígados de ratos Wistar tratados ou não com T, continuamente, durante as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do RH;
- Quantificar a apoptose nos fígados de ratos Wistar tratados ou não com T, continuamente, durante as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do RH;

-
- Quantificar danos no DNA hepático de ratos Wistar tratados ou não com T, continuamente, durante as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do RH;
 - Quantificar LPN positivas imunoistoquimicamente para a proteína p53 nos fígados de ratos Wistar tratados ou não com T, continuamente, durante as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do RH;
 - Quantificar a ativação do fator de transcrição NF- κ B no tecido hepático de ratos Wistar tratados ou não com T, continuamente, durante as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do RH;
 - Quantificar a acetilação de H3K9 nos fígados de ratos Wistar tratados ou não com T, continuamente, durante as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do RH

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 38 ratos machos, albinos, da linhagem Wistar, com pesos iniciais compreendidos entre 40 e 50 g, obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF/IQ-USP).

Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno (no máximo 4 ratos/gaiola) com tampas de aço inoxidável, contendo maravalha previamente esterilizada, a qual foi trocada rotineiramente em dias alternados. Os ratos receberam, “ad libitum” durante todo o experimento, água destilada e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes SA, Brasil). O peso corpóreo (p.c.) individual e a ingestão de ração dos animais por caixa foram acompanhados diariamente.

O ensaio biológico foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, após a devida aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais de Experimentação (Proc. no 59), em anexo, em ambiente apropriado para condução de estudos de carcinogênese, com temperatura de 22 °C + 2 °C e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 horas (claro a partir das 6h00).

3.2 Modelo de Hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente” (RH)

Dentre os vários protocolos de hepatocarcinogênese existentes para ratos, foi utilizado o modelo do RH, descrito em 1976 (SOLT; FARBER, 1976), modificado em 1987 (SEMPLE-ROBERTS et al., 1987) e adaptado para ratos Wistar (MORENO et al., 1991). Esse modelo está bem caracterizado e é particularmente adaptado para a avaliação de substâncias capazes de modular a carcinogênese (FARBER; SARMA, 1987; RIZZI et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2001; CARRASCO-LEGLEU et al., 2004).

A iniciação dos animais ocorreu pela administração intraperitoneal de uma única dose necrogênica do agente iniciante DEN (Sigma, EUA; 20 mg/100 g de p.c.) dissolvido em solução de NaCl a 0,9%. Após o período de recuperação de 2 semanas, os animais receberam 4 doses únicas de AAF em dias consecutivos (Sigma, EUA; 2,0 mg/100 g de p.c.) dissolvido em dimetilsufóxido (DMSO) e óleo de milho (OM). Vinte e quatro horas após a última aplicação de AAF os animais foram submetidos a um potente estímulo mitogênico, representado por 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 entubação gástrica uma dose única de AAF (2,0 mg/100 g de p.c.), também dissolvido em DMSO e OM.

3.3 Protocolo Experimental

A **Figura 3** mostra o protocolo experimental utilizado no estudo. Após um período de aclimação de 7 dias, os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais. Com exceção de oito animais, que constituíram o grupo Normal e, portanto, não foram sujeitos a nenhum procedimento experimental, os demais animais foram submetidos ao modelo do RH e distribuídos conforme descrito abaixo:

- Grupo tributirina (TB): os 15 ratos deste grupo receberam T (Tributirina 98%; Aldrich, USA) pura, por entubação gástrica, diariamente, na dose única de 200 mg/100 g de p.c., perfazendo um volume de 0,2 mL/100 g, em horário fixo, durante 8 semanas consecutivas, até o dia da eutanásia.
- Grupo maltodextrina (MD): os animais receberam por entubação gástrica, diariamente, no mesmo horário que o grupo TB, durante 8 semanas consecutivas até o dia da eutanásia, maltodextrina (M, CriAlimentos, Brasil) na dose de 300 mg/100 g de p.c., dissolvida em água ultra-pura, perfazendo um volume de 0,42 mL/100 g. Este grupo serviu como controle do grupo experimental TB, pois M foi fornecida em quantidade isocalórica [6 Kcal/g; (GIOIELLI, 2002)] à T.

Grupo Normal: ratos não submetidos ao protocolo experimental

Grupo maltodextrina (MD): controle – dose de maltodextrina: 300 mg/100 g de p.c.

Grupo tributirina (TB): dose de tributirina: 200 mg/100 g de p.c.

Dietilnitrosamina (DEN): 20 mg/100 g de p.c. intraperitoneal

2-acetilaminofluoreno (AAF): total de 6 doses de 2 mg/100 g de p.c., distribuídas em 4 doses antes da HP e 2 doses após, por entubação gástrica

HP: Hepatectomia parcial a 70%

E: Eutanásia

Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da atividade quimiopreventiva da T abrangendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH.

3.4 Aplicação da BrdU e eutanásia dos animais

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

Antes de serem eutanasiados, todos os animais foram pesados em balança eletrônica (BCM 1100, ACATEC, Brasil). Em seguida, os mesmos foram anestesiados com éter etílico (Merck, Brasil) e em seguida, colocados em decúbito dorsal sobre uma prancha, com inalação contínua de éter, realizando-se, a seguir, a laparotomia e punção da artéria aorta abdominal.

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

Durante o exame macroscópico, os fígados permaneceram sobre placa de vidro resfriada por mistura de gelo e gelo seco. O fígado de cada animal foi examinado individualmente quanto à presença, em sua superfície, de LPN

representadas por formações nodulares de tamanhos variados e coloração esbranquiçada, que se distinguiram do parênquima hepático (BANNASCH; ZERBAN, 1990). Após o exame da superfície, cada lobo foi seccionado em fatias de aproximadamente 3 mm de espessura, para identificação e contagem de LPN internas. Todas as lesões foram também classificadas quanto ao seu tamanho em < 1 mm ou > 1 mm.

Posteriormente, foram colhidas de cada animal amostras dos lobos hepáticos direito, triangular e caudados para: análise morfométrica de LPN GST-P positivas, exame histopatológico, avaliação da proliferação celular, apoptose e p53. Esses fragmentos, bem como amostras de duodeno dos animais, foram imediatamente fixados em metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial; Merck, Brasil) por aproximadamente 24 horas, sendo, então, submetidos às técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Cortes histológicos de aproximadamente 5 µm de espessura foram então obtidos.

Do lobo direito foram colhidas amostras para avaliação de danos no DNA, da ativação do fator de transcrição p65 e da acetilação de H3K9. Esses fragmentos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenados em “freezer” a – 80 °C (Revco, EUA).

3.6. Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas

A análise morfométrica de LPN (focos e nódulos) foi realizada em cortes histológicos hepáticos submetidos à reação imunoistoquímica para a enzima GST-P. Focos e nódulos são distintas LPN por representarem tamanhos menor e maior do que um lóbulo hepático, respectivamente (SQUIRE; LEVITT, 1975).

3.6.1 Marcação imunoistoquímica da GST-P

O método utilizado para a realização da marcação imunoistoquímica da GST-P foi o da avidina-biotina (HSU; RAINE; FANGER, 1981), empregando-se, para tanto, anticorpo policlonal anti-GST-P (Dako, Dinamarca) e anticorpo secundário biotinilado anti-imunoglobulina de coelho (Vector Laboratories, EUA). Esse último consiste em anticorpo anti-IgG conjugado à biotina.

Cada procedimento foi intercalado por lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fosfato [PBS (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KCl 2,68 mM; KH₂PO₄ 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 pela seqüência de etanol absoluto, 95% e 70% e, finalmente, água destilada.

A peroxidase endógena foi bloqueada incubando-se as lâminas por 30 minutos em metanol (Merck, Brasil) contendo 20% de peróxido de hidrogênio a 30

volumes (Merck, Brasil). Os cortes foram então, incubados com o anticorpo primário anti-GST-P na diluição de 1:1000, durante uma noite a 4o C em câmara úmida. Para diluir o anticorpo primário, foi utilizada solução contendo soro-albumina a 0,5% (albumina bovina fração V; Sigma, EUA) em água destilada e azida sódica a 5% (LabSynth, Brasil) em água destilada e PBS.

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; EUA) diluído em PBS (1:400) decorreu também por 30 minutos.

Posteriormente, foi aplicada sobre os cortes uma solução preparada com diaminobenzidina (DAB; Dako, Dinamarca). Os cortes foram contracorados pela eosina e em seguida pela hematoxilina, 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. Esse é composto por um microscópio (Olympus, Japão) ao qual se encontra acoplado uma câmera de vídeo (Sony, Japão) que se conecta a um microcomputador equipado com o programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, EUA).

As áreas de interesse foram delimitadas com um cursor e o programa forneceu suas dimensões em mm², após calibração do aparelho. Além disso, as LPN GST-P positivas foram classificadas com sendo persistentes (marcação imunoistoquímica uniforme e bordas regulares) ou em remodelação (perda da uniformidade de marcação imunoistoquímica e bordas irregulares) (WOOD; SARMA; ARCHER, 1999; SILVEIRA et al., 2001).

3.7 Exame histopatológico

Cortes histológicos de fígado obtidos por ocasião da eutanásia e fixados em metacarn foram corados com hematoxilina de Harris e eosina (H&E), basicamente como descrito por Junqueira e Junqueira (1983).

Os critérios morfológicos utilizados para a classificação das LPN hepáticas (focos e nódulos) foram os previamente descritos por Bannasch e Zerban (1990). Assim, os focos/nódulos de células claras apresentam volume aumentado e citoplasma claro e rarefeito, que se cora com pouca intensidade pela eosina e no qual há acúmulo de glicogênio. Já os focos/nódulos de células acidofílicas apresentam volume aumentado e citoplasma acidofílico, que se cora mais intensamente pela eosina, no qual também pode ocorrer acúmulo de glicogênio. Os focos/nódulos de células vacuolizadas apresentam muitas gotas de lipídeos no citoplasma e, eventualmente, no interior do núcleo. Focos/nódulos de células basofílicas são pobres ou livres de glicogênio e lipídeos, e apresentam citoplasma com basofilia difusa devido ao elevado número de ribossomos.

Além disso, por ocasião do exame histopatológico, foi avaliada a presença de células ovais, caracterizadas por apresentarem citoplasma exíguo e levemente basofílico, bem como núcleo alongado com um único nucléolo (BANNASCH; ZERBAN, 1990).

3.8 Avaliação da proliferação celular

Em cortes histológicos dos fígados obtidos por ocasião da eutanásia foi feita dupla-marcação imunoistoquímica para BrdU e GST-P. Essa técnica permite identificar células na fase S do ciclo celular e classificá-las quanto a sua localização em tecido normal ou transformado, que pode ser ainda diferenciado entre LPN persistentes ou em remodelação.

Para isso, 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; Na₂HPO₄ 10 mM; KCl 2,68 mM; KH₂PO₄ 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 pela seqüência de etanol absoluto, 95% e 70% e, finalmente, 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 sequência, 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 o 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 encontra acoplado uma câmera de vídeo (Pixelink Megapixel FireWier camera 3.2, Alemanha) que se conecta a um microcomputador equipado com o programa Axio Vision 40V 4.5 (Carl Zeiss, Alemanha). A leitura das lâminas foi feita 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/mm² 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 Normal.

3.9 Avaliação da apoptose

A avaliação da apoptose foi feita nos cortes histológicos previamente marcados para GST-P, permitindo que CA fossem quantificados em LPN hepáticas GST-P positivas persistentes ou em remodelação, bem como em áreas ao redor das LPN (“surrounding”). Para o grupo Normal, foram utilizados cortes histológicos corados apenas com H&E. O método para a análise da apoptose está baseado na observação de CA por microscopia de fluorescência, descrito por Stinchcombe et al. (1995).

Esse método mostra que CA apresentam intensa fluorescência da eosina em cortes histológicos de fígado corados com H&E. De acordo com os autores, o corte submetido à luz no comprimento de onda entre 450 a 490 nm permite a identificação de CA mais rapidamente por microscopia de fluorescência em comparação ao uso de luz transmitida normal.

A área total dos cortes histológicos foi analisada utilizando-se objetiva de 40X e à medida que os CA fluorescentes foram localizados, alternou-se para o sistema de luz transmitida normal e suas identidades foram, 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 (“surrounding”) podendo, ainda, apresentar núcleo fragmentado.

Os resultados foram expressos como número de CA/mm² de área de LPN hepáticas GST-P positivas persistentes ou em remodelação, ou de “surrounding”; e de cortes histológicos do grupo Normal. Para tais procedimentos foi utilizado

microscópio de epifluorescência (Nikon, Japão), do Laboratório de Imunologia Clínica, FCF-USP.

3.10 Avaliação de danos no DNA hepático

A avaliação de danos no DNA hepático em amostras de fígado previamente armazenadas a -80°C foi realizada utilizando-se o método do “cometa” descrito por SINGH et al. (1988), com modificações. Esse método avalia quebras nas fitas de DNA e, na versão alcalina, quebras em fitas simples e de bases oxidadas decorrentes da ação de ROS (COLLINS, 2004).

Assim, amostras de 50 mg de tecido hepático foram homogeneizadas delicadamente em PBS (NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 10 mM; KCl 2,68 mM; KH_2PO_4 1,76 mM e água ultra-pura, pH 7,4) sob refrigeração. As células isoladas foram, então, imobilizadas em matriz de agarose de baixo ponto de fusão “low-melting” (Sigma, USA) a 0,08% em PBS sobre lâmina de vidro previamente tratada com agarose “low-melting” a 0,05%.

Posteriormente, as células imobilizadas foram lisadas durante 1 hora em solução de lise (NaCl 2,5 M; Trizma base 10 mM; $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 100 mM; N-laurilsarcosina a 1%; pH 10,0 e adição de Triton X-100 a 1%) e em seguida, lavadas com água ultra-pura gelada. Na seqüência, as lâminas foram submetidas à eletroforese (NaOH 300 mM e 1 mM de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH acima de 13,0; a 25 V, por 40 minutos em cuba para eletroforese Hoefer-HE 99X, EUA), precedida de etapa de “unwinding” do DNA por 20 minutos ao abrigo da luz. A seguir, as lâminas foram

neutralizadas com solução de Tris (0,4 M, pH 7,5). Os cometas resultantes foram fixados em solução de ácido tricloroacético (TCA) a 15% e corados com nitrato de prata a 0,02%.

Amostras de tecido hepático de ratos do grupo Normal tratados ou não com peróxido de hidrogênio (concentração final 10%, 5 minutos, em temperatura ambiente e sob sonicação) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

O comprimento dos cometas foi avaliado utilizando-se sistema de análise de imagem computadorizada, composto por microscópio (Carl Zeiss Axiostar Plus, Alemanha) ao qual se encontra acoplado uma câmera de vídeo (Pixelink Megapixel FireWier camera 3.2, Alemanha) que se conecta a um microcomputador equipado com o programa Axio Vision 40V 4.5 (Carl Zeiss, Alemanha). Foram analisados aleatoriamente 50 cometas em cada lâmina, perfazendo 100 cometas por animal (TOLEDO et al., 2003).

3.11 Imunoistoquímica para p53

Para a marcação com o anticorpo anti-p53, utilizou-se o kit de marcação ImmunoCruz™ Staining Systems (Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA, anticorpos e kit), segundo manual do fabricante.

Cada procedimento foi intercalado por lavagem das lâminas em solução PBS (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KCl 2,68 mM; KH₂PO₄ 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 pela seqüência de etanol absoluto, 95% e 70% e, finalmente, água destilada.

A peroxidase endógena hepática foi bloqueada após tratamento das lâminas com metanol por 30 minutos (Merck, Brasil), contendo 20% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes (Merck, Brasil). Em seguida, as lâminas foram incubadas por 20 minutos em soro de bloqueio, e na seqüência, com o anticorpo anti-p53 diluídos na concentração de 1:100, por 2 horas. Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário biotinilado e, posteriormente, com complexo HRP-streptavidina (Amersham Biosciences, EUA). Posteriormente, os cortes sofreram reação com o substrato cromógeno DAB (Dako, Dinamarca). Em seguida, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas em Permount™.

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

O resultado foi expresso como porcentagem de LPN totais, persistentes ou remodelação positivas para p53. Essas lesões foram classificadas de acordo com

critérios morfológicos e confirmadas pelos cortes seriados das lâminas com marcação imunoistoquímica para GST-P.

3.12 Avaliação da ativação do fator de transcrição NF- κ B

Preparações de extratos protéicos nucleares dos fígados dos animais dos grupos: Normal, MD e TB foram submetidas à eletroforese de gel de poliacrilamida e “imunoblotting” para a proteína p65 (NF- κ B).

Foram realizados quatro ensaios independentes de “imunoblotting” com amostras aleatórias de extratos protéicos nucleares, perfazendo um total de 7 amostras de fígado de ratos do grupo Normal e 8 amostras de cada um dos grupos MD e TB.

3.12.1 Preparação e quantificação do extrato protéico nuclear

Para a obtenção de extratos protéicos de frações celulares nucleares e citoplasmáticas, foi utilizado o “kit” de extração citoplásmica e nuclear NE-PER® (Pierce, EUA), segundo o manual de instruções do fabricante.

Basicamente, foi pesado cerca de 50 mg de tecido hepático recolhido por ocasião da eutanásia dos ratos do grupo Normal e dos submetidos ao modelo experimental. Em seguida, ocorreram etapas de lise celular e purificação do extrato

para obtenção da fração citoplasmática. Após separação dessa e armazenamento a – 80 °C, a carioteca foi lisada e o extrato protéico nuclear foi purificado e também armazenado a – 80 °C até o momento do uso.

Para quantificação da concentração de proteínas, foi utilizado o método de absorção no ultravioleta (UV). Esse método está baseado no fato de que proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm (UV). Para tanto, utilizou-se aparelho Gene-Quant Pro (Amersham Pharmacia biotec, EUA) ajustado para leitura a 280 nm. A concentração de proteínas foi determinada a partir de curva padrão de albumina (concentração de 0 a 4000 µg/mL).

3.12.2 Western blotting de p65

Os extratos de proteína nuclear de todos os grupos experimentais foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 10% e em tampão Tris-glicina 1X, de acordo com o Método de Laemmli (LAEMMLI, 1970), utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (Hoefer mini VE Electrophoresis System, EUA). As proteínas foram então transferidas do gel para membrana de nitrocelulose Hybond-CTM extra (Amersham Biosciences, EUA), com poro de diâmetro de 0,45 µm, em uma hora e meia. Para verificar a eficácia da transferência, a membrana foi corada com Ponceau-S (USB, EUA) e em seguida, lavada com PBS (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KCl 2,68 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM e água ultra-pura, pH 7,4) e água.

O bloqueio da membrana de nitrocelulose foi feito com PBS contendo 5% de leite em pó desnatado, durante uma noite a 4 °C. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology Inc, EUA) (1:1000) diluído em PBS contendo 0,5% de leite desnatado, por uma hora e meia e em temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP (Amersham Biosciences, EUA) na diluição 1:2000 em PBS contendo 0,5% de leite desnatado por 1 hora e em temperatura ambiente. A imunodeteção foi feita utilizando-se o sistema de quimioluminescência ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Biosciences, EUA). Em seguida, um filme de raio-x (Kodak X-Omat, EUA) foi exposto a essa membrana para o desenvolvimento das bandas.

Para se quantificar as intensidades das bandas foi utilizado um densitômetro “Imaging Densitometer” (Modelo GS-700, BIO-RAD, EUA) com software específico (Molecular Analyst, BIO-RAD, EUA). Os sinais foram quantificados em unidades arbitrárias. A membrana foi corada com corante de comassie (Comassie Blue, Pierce, EUA), e os dados foram normalizados utilizando-se o sinal correspondente deste corante para corrigir as variações no carregamento das proteínas (TAO et al., 2002).

3.13 Avaliação da acetilação de H3K9

Preparações de extratos de histona dos fígados dos animais dos grupos: Normal, MD e TB foram submetidas à eletroforese de gel de poliacrilamida e “imunoblotting” para a H3K9 acetilada.

Foi realizado um ensaio de “imunoblotting” com amostras aleatórias, perfazendo um total de 3 amostras de fígado de cada um dos grupos Normal, MD e TB.

3.13.1 Extração ácida de histonas

A metodologia empregada para extração ácida de histonas foi adaptada dos protocolos de Jeong et al. (2003) e Druesne et al. (2004) para utilização em cortes de fígado obtidos por ocasião da eutanásia.

Inicialmente 50 mg de tecido foram gentilmente homogeneizados em dounce com tampão de lise gelado (Tris 10 mM; bissulfito de sódio 50 mM; Triton X-100 1%; MgCl₂ 10 mM; sacarose 8,6%; PMSF e água ultra-pura, pH 6,5). Em seguida, os núcleos foram separados por centrifugação à 700 g por 15 minutos a 4 °C, lavados com o tampão Tris-EDTA (Tris 10 mM; EDTA 13 mM; PMSF, água ultra-pura, pH 8,0) e novamente centrifugados à 700 g por 15 minutos a 4 °C para formação de pellets. Esses foram então ressuspensos com H₂SO₄ 0,6 N e incubados por uma noite a 4 °C para separação da fração solúvel em ácido.

Após centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C, a fração sobrenadante foi incubada com acetona por uma noite a – 20 °C para precipitação das histonas. Assim, após centrifugação a 12.000 g por 5 minutos a 4 °C, o pellet foi neutralizado com NaOH 3 N e em seguida ressuspensos em tampão de carregamento (uréia 5,8 M; ácido acético glacial 0,9 M; glicerol 16%; verde de metila 0,2%; 2-mercaptoetanol 4,8% e água ultra-pura) e armazenados a – 80 °C até o momento do uso.

3.13.2 Quantificação do extrato protéico

Para quantificação da concentração de proteínas, foi utilizado o mesmo método descrito no item 3.12.1.

3.13.3 Western blotting de H3K9 acetilada

O western blotting para H3K9 acetilada foi desenvolvido basicamente conforme descrito no item 3.12.2, com as seguintes modificações:

Os extratos de proteína dos grupos experimentais foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 15% e tampão Tris-glicina 1X, de acordo com o Método de Laemmli (LAEMMLI, 1970). Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de

nitrocelulose Hybond-ECLTM (Amersham Biosciences, EUA), com poro de diâmetro de 0,20 μm , no decorrer de 30 minutos.

O bloqueio da membrana foi feito com PBS (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KCl 2,68 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM e água ultra-pura, pH 7,4) contendo 3% de soro de albumina bovina, por 1 hora e em temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-acetil H3K9 (Upstate, EUA) (1:1000) diluído em PBS contendo 0,3% de soro de albumina bovina, por uma noite a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP anti-imunoglobulina de coelho (Amersham Biosciences, EUA) na diluição 1:10000.

3.14 Análise estatística

O ensaio biológico foi realizado em animais devidamente aleatorizados e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown Forsythe). Na seqüência, os dados foram analisados pelos seguintes testes:

a) Com relação aos resultados da incidência e multiplicidade de nódulos hepáticos da macroscopia, morfometria de LPN hepáticas GST-P positivas, avaliação da apoptose, da proliferação celular e de danos no DNA, imunoistoquímica para p53, da ativação de NF- κ B e da concentração hepática de AB, constatou-se que foram satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos

paramétricos de comparação de médias entre os dois grupos experimentais e aplicou-se teste t de Student bicaudal para dados independentes. Para comparação entre diferentes parâmetros de um mesmo grupo experimental, aplicou-se teste t de Student bicaudal para dados dependentes. Nos casos em que não foram observados distribuição normal e, principalmente, homogeneidade das variâncias, adotou-se o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney, para dados independentes e o teste de Wilcoxon para dados dependentes;

b) Para o resultado do tamanho dos nódulos na macroscopia foi utilizado o teste Qui-quadrado.

Os resultados foram expressos como média + desvio padrão e as análises estatísticas realizadas utilizando-se o programa STATISTICA 7.0, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Evolução do peso corpóreo

A evolução do peso corpóreo dos animais foi avaliada com o intuito de se verificar a aplicação adequada do modelo do RH, bem como observar possíveis efeitos tóxicos da T no mesmo, já que não há estudos na literatura indicando efeitos dessa substância na hepatocarcinogênese.

As curvas da evolução do peso corpóreo e do consumo de ração são apresentadas pelas **Figuras 4 e 5**, respectivamente. Os resultados, como indicados na **Tabela 1**, mostram que não houve diferença ($p > 0,05$) em nenhum dos parâmetros comparados entre os animais dos grupos Normal, MD e TB.

Os animais submetidos ao modelo do RH (MD e TB) apresentaram queda pronunciada tanto no peso quanto no consumo de ração após a aplicação da DEN e após a hepatectomia parcial, com relativa estabilização de peso no período de administração do AAF (**Figuras 4 e 5**).

Grupo Normal: ratos não submetidos ao protocolo experimental

Grupo maltodextrina (MD): controle – dose de maltodextrina: 300 mg/100 g de p.c.

Grupo tributirina (TB): dose de tributirina: 200 mg/100 g de p.c.

Dietilnitrosamina (DEN): 20 mg/100 g de p.c. intraperitoneal

2-acetilaminofluoreno (AAF): total de 6 doses de 2 mg/100 g de p.c., distribuídas em 4 doses antes da HP e 2 doses após, por entubação gástrica

HP: Hepatectomia parcial a 70%

E: Eutanásia

Figura 4. Curva de evolução do peso corpóreo de ratos Wistar do grupo Normal e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH.

Grupo Normal: ratos não submetidos ao protocolo experimental

Grupo maltodextrina (MD): controle – dose de maltodextrina: 300 mg/100 g de p.c.

Grupo tributirina (TB): dose de tributirina: 200 mg/100 g de p.c.

Dietilnitrosamina (DEN): 20 mg/100 g de p.c. intraperitoneal

2-acetilaminofluoreno (AAF): total de 6 doses de 2 mg/100 g de p.c., distribuídas em 4 doses antes da HP e 2 doses após, por entubação gástrica

HP: Hepatectomia parcial a 70%

E: Eutanásia

Figura 5. Consumo de ração de ratos Wistar do grupo Normal e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH.

Os dados semelhantes do peso inicial entre os grupos MD e TB mostram que os animais foram aleatorizados adequadamente no início do experimento e que a M pode ser utilizada como um bom controle isocalórico da T, confirmando a recomendação que elege o carboidrato como o mais adequado para controlar o efeito calórico dos lipídeos (GLAUERT, 1993).

A mortalidade de cerca de 30% dos animais dos grupos MD e TB ocorreu somente nas 2 semanas que se sucederam à hepatectomia parcial, período este já observado como crítico em outros experimentos conduzidos no laboratório com o modelo do RH (ESPÍNDOLA et al., 2005; FONSECA et al., 2005; ONG et al., 2006). De um modo geral, todos os animais que vieram a óbito apresentavam estado debilitado, representado por apatia, perda de peso e redução no consumo de ração progressivos. À necropsia, observou-se que os fígados de alguns animais não regeneraram adequadamente após a hepatectomia parcial, pois se apresentavam atrofiados e com tonalidade clara, possíveis indícios de insuficiência hepática.

Os resultados da **Tabela 1** mostram que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os 3 grupos em relação aos pesos absoluto e relativo do fígado (peso do fígado/100 g de p.c.).

Tabela 1 - Pesos corpóreos e dos fígados e consumo de ração de ratos Wistar do grupo Normal e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH.

Grupo	n	Peso corpóreo inicial * (g)	Peso corpóreo final * (g)	Peso do fígado * (g)	Peso relativo do fígado * (g/100g de p.c.)	Consumo médio de ração * (g/100g de p.c./dia)
Normal	8	64 ± 9	309 ± 52	8,7 ± 1,5	2,8 ± 0,1	11 ± 2
MD	10	65 ± 7	235 ± 32	8,0 ± 2,0	3,4 ± 0,5	9 ± 4
TB	10	65 ± 7	250 ± 45	7,7 ± 1,6	3,1 ± 0,4	9 ± 3

n = número de animais

Grupo maltodextrina (MD)

Grupo tributirina (TB)

*média ± desvio-padrão

Teste *t* de Student para amostras independentes

4.2 Exame macroscópico dos fígados

O fígado de todos os animais que vieram a óbito antes da 8ª semana de ensaio biológico foi examinado macroscopicamente. Em alguns casos, observaram-se sinais que poderiam sugerir um quadro de ascite e/ou de insuficiência hepática aguda. Além disso, em torno de uma semana após a hepatectomia parcial já era possível a visualização de LPN na forma de nódulos esbranquiçados em alguns animais.

Por ocasião da eutanásia, os fígados foram analisados macroscopicamente para detecção de LPN, que foram também classificadas quanto ao tamanho, tanto na superfície hepática, como ao corte de 3 mm de espessura (**Tabela 2** e **Figuras 6** e **7**).

Assim, é possível se verificar na **Tabela 2** que em comparação aos animais do grupo controle MD (**Figura 6**), ratos do grupo TB (**Figura 7**) apresentaram menor

($p < 0,05$) multiplicidade de LPN hepáticas que, além disso, tinham menor ($p < 0,05$) tamanho. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos MD e TB em relação à incidência de nódulos hepáticos.

Tabela 2 – Incidência, multiplicidade e porcentagem por tamanho de LPN hepáticas visíveis à macroscopia observadas por ocasião da eutanásia de ratos Wistar tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH.

Grupos	Ratos com nódulos/n do grupo	Incidência de nódulos (%)	Multiplicidade de nódulos *	% de nódulos por tamanho	
				< 1 mm	≥ 1 mm
MD	10/10	100	252 ± 50	79	21
TB	8/10	80	101 ± 27 ^a	96 ^b	4 ^b

n = número de animais

Grupo maltodextrina (MD)

Grupo tributirina (TB)

*média ± desvio-padrão

^a $p < 0,05$ teste *t* de Student para amostras independentes

^b $p < 0,05$ teste Qui-quadrado para amostras independentes

Figura 6. Fotografia digital de fígado do grupo controle MD. Observar a presença de LPN hepáticas, em forma de nódulos de hepatócito, indicadas pelas setas.

Figura 7. Fotografia digital de fígado do grupo TB. Observar a presença de LPN hepáticas, em forma de nódulos de hepatócito, indicadas pelas setas.

4.3 Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas

A **Tabela 3** apresenta dados da análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas totais (persistentes + em remodelação). Em relação ao número dessas LPN, observa-se que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos TB e MD. Em comparação ao grupo MD, o TB mostrou menores ($p < 0,05$) dimensões de LPN hepáticas positivas para GST-P totais, que ocupavam menor ($p < 0,05$) área do corte (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas totais (persistentes + em remodelação) de ratos Wistar tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH.

Grupos	n	nº de LPN totais/cm ² *	Área das LPN totais (mm ²) *	% da Área do corte ocupada por LPN totais *
MD	10	145 ± 36	0,26 ± 0,11	37 ± 16
TB	10	137 ± 39	0,14 ± 0,09 ^a	19 ± 14 ^a

LPN totais = lesões pré-neopásicas hepáticas GST-P positivas totais

n = número de animais

Grupo maltodextrina (MD)

Grupo tributirina (TB)

*média ± desvio-padrão

^a $p < 0,05$ teste *t* de Student para amostras independentes

Os resultados apresentados na **Tabela 4** mostram que não houve redução ($p > 0,05$) no número das LPN hepáticas GST-P positivas persistentes (**Figura 8**) do grupo TB em relação ao seu controle, MD. Observa-se ainda na **Tabela 4** que o grupo TB apresentou menor tamanho ($p < 0,05$) e porcentagem ($p < 0,05$) da área do corte ocupada pelas LPN hepáticas GST-P positivas persistentes quando comparado ao grupo MD.

Tabela 4 - Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas persistentes de ratos Wistar tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH.

Grupos	n	nº de LPN P/cm ² *	Área das LPN P (mm ²) *	% da Área do corte ocupada por LPN P *
MD	10	97 ± 30	0,33 ± 0,13	34 ± 17
TB	10	74 ± 32	0,20 ± 0,13 ^a	17 ± 13 ^a

LPN P = lesões pré-neopásicas hepáticas GST-P positivas persistentes

n = número de animais

Grupo maltodextrina (MD)

Grupo tributirina (TB)

*média ± desvio-padrão

^a p < 0,05 teste t de Student para amostras independentes

Em relação às LPN hepáticas positivas para GST-P em remodelação (**Figura 9**), não houve diferença (p > 0,05) quanto ao número de lesões, tamanho ou área do corte ocupada pelas mesmas entre os grupos TB e MD (**Tabela 5**).

De acordo com a **Tabela 5**, o grupo TB apresentou maior (p < 0,05) porcentagem de LPN hepáticas em remodelação positivas para GST-P em comparação ao controle MD.

Figura 8. Fotomicrografia de corte histológico de fígado do grupo MD. Verificar imunomarcação pela GST-P em foco de hepatócito considerado como “persistente” (observar bordas definidas e marcação uniforme). Objetiva de 10X.

Figura 9. Fotomicrografia de corte histológico de fígado do grupo MD. Verificar imunomarcação pela GST-P em foco de hepatócito considerado como “em remodelação” (observar bordas irregulares e marcação não-uniforme no interior do foco). Objetiva de 10X.

Tabela 5 - Análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas em remodelação de ratos Wistar tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH.

Grupos	n	nº de LPN R/cm ² *	Área das LPN R (mm ²) *	% da Área do corte ocupada por LPN R *	% LPN R
MD	10	49 ± 28	0,07 ± 0,04	3 ± 2	33 ± 15
TB	10	63 ± 15	0,05 ± 0,03	3 ± 2	48 ± 11 ^a

LPN R = lesões pré-neopásicas hepáticas GST-P positivas em remodelação

n = número de animais

Grupo maltodextrina (MD)

Grupo tributirina (TB)

*média ± desvio-padrão

^a p < 0,05 teste t de Student para amostras independentes

4.4 Avaliação histopatológica

Em ambos os grupos submetidos ao modelo do RH (MD e TB), o exame histopatológico revelou LPN das linhagens glicogenótica e acidofílica (BANNASCH, ZERBAN, 1990; BANNASCH, NEHRBASS, KOPP-SCHNEIDER, 2001), com predominância de LPN do tipo misto constituídas por células acidófilicas e vacuolizadas. Em segundo lugar em frequência, foram observadas LPN mistas compostas por células acidofílicas, basofílicas e vacuolizadas, seguidos pelas LPN mistas basofílicas e vacuolizadas.

LPN constituídas apenas por células vacuolizadas, ou acidofílicas (**Figura 10A**), ou basofílicas (**Figura 10B**), e LPN do tipo misto com células basofílicas e vacuolizadas foram raras em ambos os grupos, com maior ocorrência no TB. LPN

compostas por células claras (**Figura 11**) ocorreram apenas no grupo TB, e adenomas foram detectados somente no grupo MD.

No grupo TB, a presença de células ovais foi considerada de escassa a moderada (**Figura 12A**) e no controle MD, de moderada a abundante (**Figura 12B**).

Figura 10. Fotomicrografia de corte histológico de fígado do grupo MD. Verificar a presença de foco acidofílico (**A**) e basofílico (**B**). Coloração com H&E. Objetiva de 10X.

Figura 11. Fotomicrografia de corte histológico de fígado do grupo TB. Verificar a presença de foco de células claras. Coloração com H&E. Objetiva de 10X.

Figura 12. Fotomicrografia de corte histológico de fígado. **A.** Verificar a presença de proliferação de células ovais escassa no grupo TB (**A**) e abundante no grupo MD (**B**). Coloração com H&E. Objetiva de 10X.

4.5 Quantificação da proliferação celular

A dupla-marcação imunoistoquímica para GST-P e BrdU em cortes histológicos de fígados obtidos por ocasião da eutanásia pode ser observada na **Figura 13**.

Os resultados da **Tabela 6** mostram que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos MD e TB em relação ao número de marcações para BrdU nas LPN GST-P positivas totais (persistentes + em remodelação), persistentes e em remodelação.

Nos grupos submetidos ao modelo do RH (MD e TB), notou-se aumento ($p < 0,05$) do número de marcações para BrdU nas LPN GST-P positivas totais, persistentes e em remodelação em relação ao grupo Normal. Ao comparar LPN GST-P positivas totais, persistentes e em remodelação à área ao redor das lesões (“surrounding”), observa-se aumento ($p < 0,05$) no número de marcação para BrdU tanto no grupo MD, quanto no TB.

Por sua vez, o “surrounding” dos grupos MD e TB não apresentou diferença ($p > 0,05$) no número de marcações para BrdU em relação ao grupo Normal (**Tabela 6**).

Figura 13. Fotomicrografias de corte histológico de fígado do grupo MD. Verificar dupla-marcação imunoistoquímica para GST-P (rosa) e BrdU (marrom). **A.** As setas indicam marcações para BrdU em LPN hepática persistente GST-P positiva. Objetiva de 10X. **B.** Detalhe da marcação para BrdU em núcleos de hepatócitos. Objetiva de 40X.

Tabela 6 – Quantificação de núcleos de hepatócitos marcados imunoistoquimicamente para BrdU por mm² de fígado de ratos do grupo Normal e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH

Grupos	n	nº de marcações			
		para BrdU/mm ² no tecido normal ou não pré- neoplásico *	nº de marcações para BrdU/mm ² em LPN totais *	nº de marcações para BrdU/mm ² nas LPN P *	nº de marcações para BrdU/mm ² nas LPN R *
Normal	8	1,0 ± 0,8	-	-	-
MD	10	2,7 ± 1,1	10,4 ± 6,0 ^{a,b}	10,3 ± 5,9 ^{a,b}	11,6 ± 9,2 ^{a,b}
TB	10	1,7 ± 1,2	7,1 ± 4,0 ^{a,b}	6,6 ± 5,0 ^{a,b}	9,7 ± 12,9 ^{a,b}

LPN totais = lesões pré-neopásicas hepáticas GST-P positivas totais

LPN P = lesões pré-neoplásicas hepáticas GST-P positivas persistentes

LPN R = lesões pré-neoplásicas hepáticas GST-P positivas em remodelação

n = número de animais

Grupo maltodextrina (MD)

Grupo tributirina (TB)

*média ± desvio-padrão

(^b vs grupo Normal) p < 0,05 teste t de Student para amostras independentes

(^a vs “surrounding” do próprio grupo) p < 0,05 t de Student para amostras dependentes

4.6 Quantificação da apoptose

A **Tabela 7** apresenta a quantificação da apoptose, avaliada pela contagem de CA fluorescentes (**Figura 14**) em LPN hepáticas previamente marcadas imunoistoquimicamente para GST-P. A **Tabela 7** apresenta um maior (p < 0,05) número de CA nas LPN hepáticas GST-P positivas em remodelação do grupo TB em comparação ao MD. Não houve diferença (p > 0,05) entre os grupos em relação ao número de CA nas LPN hepáticas GST-P positivas totais (persistentes + em remodelação) ou persistentes.

Na **Tabela 7**, nota-se ainda que no grupo TB, há um aumento ($p < 0,05$) no número de CA nas LPN hepáticas GST-P positivas em remodelação em relação às próprias LPN hepáticas GST-P positivas persistentes, o que não ocorre ($p > 0,05$) no grupo controle MD.

Nos grupos submetidos ao modelo do RH (MD e TB) o número de CA nas LPN hepáticas GST-P positivas totais, persistentes e em remodelação é maior ($p < 0,05$) do que seus respectivos tecidos não pré-neoplásicos (“surrounding”) (**Tabela 7**).

As LPN hepáticas GST-P positivas totais, persistentes e em remodelação dos grupos MD e TB apresentaram maior ($p < 0,05$) número de CA quando comparadas às do grupo Normal (**Tabela 7**). No tecido não pré-neoplásico (“surrounding”) dos grupos submetidos ao modelo do RH (MD ou TB) não houve diferença ($p > 0,05$) em relação ao grupo Normal.

Tabela 7 – Quantificação de CA no grupo Normal e “surrounding”, LPN hepáticas GST-P positivas totais (persistentes + em remodelação), persistentes e em remodelação dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH.

Grupos	n	nº de CA/mm ² no			
		tecido normal ou não pré-neoplásico *	nº de CA/mm ² em LPN totais *	nº de CA/mm ² nas LPN P *	nº de CA/mm ² nas LPN R *
Normal	8	0,33 ± 0,27	-	-	-
MD	10	0,22 ± 0,17	3,0 ± 2,6 ^{b,d}	2,8 ± 2,7 ^{b,d}	5,6 ± 6,1 ^{b,d}
TB	10	0,23 ± 0,16	4,9 ± 3,5 ^{b,d}	2,1 ± 1,6 ^{b,d}	13,9 ± 11,8 ^{a,b,c,d}

LPN totais = lesões pré-neoplásicas hepáticas GST-P positivas totais

LPN P = lesões pré-neoplásicas hepáticas GST-P positivas persistentes

LPN R = lesões pré-neoplásicas hepáticas GST-P positivas em remodelação

n = número de animais

Grupo maltodextrina (MD)

Grupo tributirina (TB)

*média ± desvio-padrão

(^a vs MD; ^d vs grupo Normal) $p < 0,05$ teste *t* de Student para amostras independentes

(^b vs “surrounding” do próprio grupo; ^c vs LPN P do próprio grupo) $p < 0,05$ *t* de Student para amostras dependentes

Figura 14. Fotomicrografias de corpúsculo apoptótico detectado em corte histológico de fígado corado com H&E do grupo MD. A seta indica o corpúsculo apoptótico observado em luz transmitida normal (**A**) e em microscopia de fluorescência (**B**). Objetiva de 40X.

4.7 Quantificação de danos no DNA

Observa-se na **Tabela 8** que amostras de fígado de ratos normais tratadas com peróxido de hidrogênio (controle positivo da técnica) apresentaram cometas de maior ($p < 0,05$) comprimento em relação às aquelas não tratadas com o agente oxidante em questão (grupo Normal, controle negativo da técnica).

Entre os grupos submetidos ao modelo do RH (MD e TB), não houve diferença ($p > 0,05$) no comprimento dos cometas (**Figura 15**). Em relação ao grupo Normal, ambos os grupos TB e MD, apresentaram maior ($p < 0,05$) comprimento dos cometas.

Tabela 8 – Comprimento dos cometas (μm) do grupo Normal, (controle negativo), grupo C+ e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH.

Grupos	n	Comprimento do cometa em μm^*
Normal	8	$67,7 \pm 4,5$
MD	10	$84,8 \pm 6,5^a$
TB	10	$85,5 \pm 7,2^a$
C+	4	$157,3 \pm 4,0^a$

n = número de animais

Grupo maltodextrina (MD)

Grupo tributirina (TB)

Grupo controle positivo (C+)

*média $\pm$ desvio-padrão

(^a vs grupo Normal) $p < 0,05$ teste *t* de Student para amostras independentes

Figura 15. Fotomicrografia de cometa do grupo MD. Objetiva de 10X.

4.8 Imunoistoquímica para p53

A marcação imunoistoquímica para a proteína p53 foi observada somente nas LPN hepáticas e, portanto, foi ausente nas áreas adjacentes às lesões (“surrounding”) e no grupo Normal. Predominantemente, nos grupos submetidos ao modelo do RH (MD e TB), observou-se marcação citoplasmática para p53 (**Figura 16**), diferentemente do controle positivo (**Figura 17**), que apresentou marcação nuclear para a proteína.

Os resultados apresentados na **Tabela 9** mostram que o grupo TB apresentou menor ($p < 0,05$) porcentagem de LPN hepáticas GST-P positivas totais (persistentes + em remodelação) e persistentes com marcação citoplasmática para p53 quando comparado ao grupo controle MD. Não houve diferença ($p > 0,05$) na porcentagem de LPN hepáticas GST-P positivas em remodelação marcadas para p53 entre os grupos TB e MD.

Pôde-se observar ainda que não houve diferença ($p > 0,05$) entre as porcentagens de LPN hepáticas persistentes e em remodelação GST-P positivas marcadas para p53 no grupo TB. No entanto, no grupo MD, notou-se maior ($p < 0,05$) porcentagem de LPN hepáticas GST-P positivas persistentes marcadas para p53 do que LPN hepáticas GST-P positivas em remodelação (**Tabela 9**).

Figura 16. Fotomicrografias de corte histológico de fígado do grupo MD. **A.** LPN persistente marcada para p53. Objetiva de 10X. **B.** Detalhe de LPN persistente marcada para p53. Objetiva de 20X. **C.** A seta indica imunomarcção citoplasmática de p53 em hepatócitos de uma LPN persistente. Objetiva de 40X.

Figura 17. 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.

Tabela 9 – Porcentagem de LPN hepáticas totais (persistentes + em remodelação), persistentes ou em remodelação com marcação imunoistoquímica citoplasmática para p53 do grupo Normal e dos grupos tratados com M ou T durante 8 semanas consecutivas, em período compreendendo as etapas de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH

Grupo	n	% de LPN Totais p53 ⁺ *	% de LPN P p53 ⁺ *	% LPN R p53 ⁺ *
MD	10	23,9 ± 15,3	36,1 ± 27,1 ^b	6,4 ± 7,4
TB	10	11,1 ± 7,9 ^a	14,2 ± 10,0 ^a	5,7 ± 8,2

LPN totais = lesões pré-neoplásicas hepáticas totais

LPN P = lesões pré-neoplásicas hepáticas persistentes

LPN R = lesões pré-neoplásicas hepáticas em remodelação

n = número de animais

Grupo maltodextrina (MD)

Grupo tributirina (TB)

*média ± desvio-padrão

(^a vs MD) p < 0,05 teste t de Student para amostras independentes

(^b vs LPN R do próprio grupo) p < 0,05 t de Student para amostras dependentes

4.9 Quantificação da ativação do fator de transcrição NF-κB

A **Figura 18** apresenta bandas obtidas pela técnica de “western blotting”. A leitura de intensidade das bandas foi efetuada por meio de densitometria. Os valores assim obtidos foram expressos em unidades densitométricas arbitrárias, e os resultados podem ser graficamente visualizados na **Figura 19**.

Os grupos submetidos ao modelo do RH (MD e TB) apresentaram aumento (p < 0,05) da presença de p65 nuclear, quando comparados ao grupo Normal. O grupo TB mostrou menor (p < 0,05) presença de p65 nuclear quando comparado ao seu controle, MD.

N = Grupo Normal

MD = Grupo maltodextrina

TB = Grupo tributirina

Figura 18. “Western blotting” da proteína p65 de extratos nucleares de fígado do grupo Normal e dos grupos MD e TB. As bandas estão na altura de 65 kDa, correspondente ao p65.

N = Grupo Normal

MD = Grupo maltodextrina

TB = Grupo tributirina

Figura 19. Normalização do “western blotting” da proteína p65 em relação ao carregamento de proteínas na membrana. Os valores (média $\pm$ desvio padrão) estão expressos em unidades densitométricas arbitrárias. $p < 0,05$ *t* de Student para amostras independentes (^a vs grupo Normal; ^b vs MD).

4.10 Quantificação da acetilação de H3K9

As bandas obtidas pelo “western blotting” de H3K9 acetilada podem ser visualizadas na **Figura 20**. A leitura da intensidade dessas bandas por um densitômetro foi utilizada como meio para quantificar a resposta nos diferentes grupos.

De acordo com a leitura, representada graficamente pela **Figura 21**, observa-se que o grupo Normal tendeu a apresentar maior acetilação de H3K9 em relação aos grupos submetidos ao modelo do RH. Em relação ao grupo MD, TB tendeu a apresentar maior acetilação de H3K9.

N = Grupo Normal

MD = Grupo maltodextrina

TB = Grupo tributirina

Figura 20. “Western blotting” de H3K9 acetilada de fígado do grupo Normal e dos grupos MD e TB. As bandas estão na altura de 17 kDa, correspondente à H3.

N = Grupo Normal

MD = Grupo maltodextrina

TB = Grupo tributirina

Figura 21. Representação gráfica da densitometria das bandas de H3K9 acetilada. Os valores (média $\pm$ desvio padrão) estão expressos em unidades densitométricas arbitrárias.

5 DISCUSSÃO

Em vista da crescente incidência e mortalidade por câncer no mundo e à alta complexidade dessa doença, a quimioprevenção destaca-se como importante medida de controle (SPORN; SUH, 2002; CHEN; KONG, 2005). Nesse sentido, diversos compostos bioativos presentes em alimentos, como o AB, são considerados quimiopreventivos (KELLOFF et al., 1994; SURH, 2003; LIU, 2004). Porém, a meia-vida curta dessa substância demanda aplicações contínuas, dificultando seu uso na quimioprevenção. Assim, torna-se favorável a utilização do pró-fármaco do AB, a T, substância que apresenta meia-vida mais prolongada e que pode ser administrada oralmente (EGORIN et al., 1999). Além disso, estudos in vitro demonstraram maior eficiência na inibição da carcinogênese pelo tratamento com T em comparação ao uso do AB (CHEN; BREITMAN, 1994; KUEFER et al., 2004).

A avaliação de um potencial agente quimiopreventivo envolve estudos in vitro, com posterior aplicação em um modelo de carcinogênese in vivo para que possa ser submetido a ensaios clínicos em humanos (STEELE et al., 1994; 1996; GREENWALD, 2002).

Nesse contexto, este estudo apresenta de forma inédita a avaliação da atividade quimiopreventiva da T na hepatocarcinogênese experimental em ratos. Para tanto, utilizou-se o modelo do RH, que é adequado para a avaliação de substâncias capazes de modular o processo neoplásico (SOLT; FARBER, 1976; CARRASCO-LEGLEU et al., 2004; ESPÍNDOLA et al., 2005; ONG et al., 2006).

Assim, o presente estudo mostrou que o tratamento com T resultou em atividade quimiopreventiva promissora na hepatocarcinogênese, demonstrada pela

menor multiplicidade e tamanho de nódulos hepáticos na macroscopia. Além disso, esses dados foram confirmados de forma já mais refinada pela análise morfométrica de LPN hepáticas GST-P positivas.

Os resultados da morfometria revelaram menor tamanho de LPN totais GST-P positivas e menor área do corte ocupada pelas mesmas no grupo tratado com T. Esses efeitos nas LPN totais talvez sejam decorrentes da atuação da T nas LPN persistentes, que também apresentaram menor dimensão e ocuparam menor área do corte. Desse modo, vale ressaltar que esses resultados demonstram ação inibitória da T em LPN persistentes, que se descreve que deverão evoluir, ao menos em parte, para hepatocarcinomas (FARBER; SARMA, 1987; DE MIGLIO et al., 2003; RIZZI et al., 1997; FONSECA et al., 2005).

Além disso, esses dados sugerem a ocorrência de atividade quimiopreventiva da T na fase de promoção da hepatocarcinogênese, mas não na de iniciação, uma vez que o tratamento com essa substância não reduziu o número de LPN totais e persistentes.

De acordo com Wattenberg (1985), agentes quimiopreventivos podem ser classificados em duas categorias: bloqueadores, que previnem a iniciação da carcinogênese, e supressores, que inibem a promoção e progressão das células iniciadas. Além disso, Stoner, Morse e Kelloff (1997) caracterizaram os agentes bloqueadores como inibidores de enzimas de fase I ou II, de modo a interferirem na ativação e metabolização dos xenobióticos, ou ainda como antioxidantes, por impedirem ou diminuírem a formação de ROS. Por outro lado, agentes supressores promovem a indução da apoptose e da diferenciação celular, a melhora da comunicação intercelular, e outras ações (STONER; MORSE; KELLOFF, 1997).

Assim, Kelloff et al. (1994) já haviam classificado o AB como agente quimiopreventivo supressor da carcinogênese. Portanto, com essa classificação, há indícios de que neste estudo a T, pró-fármaco do AB, tenha atuado como supressora da hepatocarcinogênese, em vista dos resultados demonstrados pela macroscopia e análise morfométrica das LPN, que sugerem inibição da fase de promoção da hepatocarcinogênese. Carbone et al. (2004) ressaltaram que a iniciação é inócua até que ocorra a promoção e, portanto, substâncias que atuam na fase de promoção podem ser consideradas agentes quimiopreventivos promissores.

Esses resultados do presente estudo estão de acordo com Belobrajdic e McIntosh (2000), que demonstraram atividade quimiopreventiva da T em modelo de carcinogênese de mama induzida por nitrosometiluréia (NMU) em ratas. Ao longo de todo ensaio (14 semanas a partir da iniciação), T (100 ou 300 mg/100 g de p.c.*) foi adicionada à fração lipídica da ração. Os autores relataram que a administração de T não reduziu a incidência dos primeiros nódulos palpáveis (7 semanas) e dos nódulos (adenomas, adenocarcinomas e carcinomas) observados na 14ª semana. Vale destacar que somente no grupo tratado com T (300 mg/100 g de p.c.), dose próxima da utilizada no presente estudo, houve menor multiplicidade de nódulos.

Em contrapartida, Deschner et al., (1990) não relataram ação quimiopreventiva digna de nota da T na carcinogênese de cólon induzida por azoximetano (AOM). Após 48 semanas da iniciação e de tratamento dos animais com T (500 mg/100 g de p.c.*) adicionada à ração de camundongos, não houve redução da incidência, número e tamanho de focos displásicos.

Estudos in vivo com o AB, metabólito da T, também são raros na literatura. A maior parte utilizou modelos de carcinogênese de cólon e observou atividade quimiopreventiva do AB pela inibição de focos de criptas aberrantes (ACF),

* Dose calculada com base no consumo de ração dos animais do presente estudo.

consideradas LPN no cólon de ratos e humanos (MCLELLAN; BIRD, 1988). Nesse sentido, Medina et al. (1998) aplicaram infusão intracecal contínua de AB (1,5 mL/h) durante todo período denominado de “indução” (4 semanas) do modelo de carcinogênese de cólon com 1,2-dimetilhidrazina (DMH) em ratos. Ao final do ensaio (11 semanas), houve redução na incidência de ACF e carcinomas no grupo que recebeu AB, porém, sem redução no número dessas lesões. Além disso, pela análise histopatológica, os autores relacionaram o tratamento com AB à inibição da transformação maligna.

Em outro estudo, Wong et al. (2005) administraram AB por infusão no cólon de ratos (40 μ mol/mL/2 vezes ao dia ou 400 μ mol/mL, 5 vezes ao dia) durante 4 semanas, em modelo de carcinogênese de cólon induzido por AOM. Ambos os tratamentos com AB reduziram o número de ACF ao final do experimento, mas de forma mais pronunciada com o protocolo de administração 5 vezes ao dia. No mesmo sentido, a instilação intrarectal de AB (50 e 100 mM) em ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH resultou em menor número de ACF (AVIVI-GREEN et al., 2000).

Por outro lado, a administração oral do AB não apresentou atividade quimiopreventiva na maioria dos estudos in vivo. Caderni et al. (1998; 2001) forneceram AB (150 mg/dia) em “pellets” de liberação lenta em uma dieta de elevado teor lipídico por 10 ou 33 semanas, a ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon induzido por AOM. Ao final dos experimentos, não houve redução do número e multiplicidade de ACF e carcinomas em decorrência do tratamento com AB. No mesmo modelo de carcinogênese, Wargovich et al. (1996) administraram AB (12,5 ou 25 mg/100 g de p.c.*) na ração de ratos por 5 semanas, e observaram leve redução do número de ACF com a maior dose de AB. Freeman (1986) administrou

* Dose calculada com base no consumo de ração dos animais do presente estudo.

AB (1 a 2%) na água de beber e não constatou atividade quimiopreventiva no modelo de carcinogênese de cólon induzido por DMH. Na carcinogênese de mama induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno, a adição do AB (dose 600 mg/100 g de p.c.*) à ração com alto teor de lipídeos poliinsaturados de ratas reduziu a multiplicidade de nódulos malignos (YANAGI; YAMASHITA; IMAI, 1993).

No contexto da caracterização de um quimiopreventivo ideal deve-se considerar a facilidade na administração, principalmente por se tratar de utilização prolongada (DE FLORA; FERGUSON, 2005). Deste modo, ao observar os dados dos ensaios in vivo com o AB, notam-se indícios da necessidade de infusão contínua para que esta substância exerça atividade quimiopreventiva na carcinogênese. Assim, de acordo com resultados do presente estudo, a T parece consistir em uma melhor alternativa ao uso do AB, pela ação quimiopreventiva da hepatocarcinogênese alcançada por tratamento via oral, e uma vez ao dia. Além disso, neste ensaio utilizou-se a entubação gástrica como forma de administração, garantindo a ingestão da T na dose de escolha, e não conforme o consumo de ração dos animais, que pode ser influenciado por fatores como sabor e odor da substância, estresse, aplicação de modelo de carcinogênese, entre outros.

Agentes quimiopreventivos não devem apresentar, se possível, toxicidade, conforme enfoque dado por Sporn e Suh (2002). Nesse sentido vale ressaltar que neste estudo, o tratamento com T resultou em quimioprevenção na dosagem utilizada, sem demonstrar sinais clínicos que pudessem sugerir toxicidade. Além disso, o peso relativo dos fígados e as curvas de crescimento e consumo de ração foram semelhantes entre os grupos MD e TB, sugerindo ausência de efeitos deletérios por parte da T. Esses dados indicam que apenas as particularidades inerentes ao modelo do RH foram responsáveis pelo menor peso corpóreo final dos

* Dose calculada com base no consumo de ração dos animais do presente estudo.

grupos MD e TB em comparação ao Normal.

Os resultados da morfometria mostraram, ainda, que o grupo TB apresentou maior porcentagem de LPN hepáticas positivas para GST-P em remodelação em comparação às LPN totais (% Remodelação/Totais). Essa observação sugere que a T induz o fenômeno da remodelação, definida por Farber (1980) como um processo de reversão de LPN a um aspecto de fígado “normal”, também denominado regressão, que pode ser muito similar ao retorno do tecido a um estado quiescente (G0). No mesmo sentido, outros autores caracterizaram esse evento 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).

Assim, acredita-se que a remodelação possa envolver a rediferenciação dos hepatócitos das LPN para um fenótipo semelhante ao do adulto, com a possibilidade da ocorrência de uma reposição progressiva de hepatócitos a partir do “surrounding” (TATEMATSU; NAGAMINE; FARBER, 1983; FARBER; RUBIN, 1991). Segundo esse conceito, o bloqueio desse processo de rediferenciação pode caracterizar a persistência de LPN (FARBER, 1980).

Deve-se ressaltar, entretanto, que a pequena população de LPN persistentes apresenta o mesmo padrão bioquímico observado na maioria das LPN que sofre remodelação (FARBER; SARMA, 1987; FARBER, 1990). Desse modo, não é claro se LPN em remodelação derivam de células precursoras distintas ou se refletem a ausência de eventos genéticos acumulados necessários para a progressão (FEO et al., 2000).

Alguns autores relataram que LPN em remodelação apresentam menor potencial de crescimento que LPN persistentes. Esse fato, segundo os autores,

estaria em parte relacionado à maior indução de apoptose e menor proliferação celular nas LPN em remodelação, já que o perfil oposto está presente nas persistentes (SCHULTE-HERMANN et al., 1990).

De qualquer forma, a informação para este evento espontâneo, com uma expressão gênica bastante complexa, parece já estar normalmente inserida no genoma (FARBER; RUBIN, 1991).

Nesse contexto, a maior indução da remodelação caracteriza linhagens de ratos resistentes ao hepatocarcinoma, como Copenhagen e Brown Norway, comparadas às linhagens susceptíveis, como F344 e Marshall. Estudos demonstraram que essa propriedade que animais resistentes apresentam de induzir a remodelação estaria relacionada a “genes de resistência” (WOOD; SARMA; ARCHER, 1999; WOOD; KORKOLA; ARCHER, 2002; DE MIGLIO et al., 2003), cuja atividade poderia estar sendo, eventualmente, modulada pela T, no caso.

Os resultados da avaliação da apoptose demonstraram que o grupo TB apresentou maior número de CA nas LPN hepáticas GST-P positivas em remodelação em relação ao grupo MD. O mesmo efeito não foi constatado nas LPN persistentes, indicando que neste estudo a indução da apoptose possa estar relacionada ao fenômeno da remodelação. Essa ação é evidenciada pela diferença entre os números de CA nas LPN, maior nas LPN em remodelação em relação às persistentes do grupo tratado com T. Essas observações confirmam experimento prévio desenvolvido em nosso laboratório, que igualmente observou maior número de CA nas LPN em remodelação (MAZZANTINI, 2005).

Além disso, esses resultados estão de acordo com alguns estudos in vivo com o AB. Caderni et al. (1998; 2001) forneceram AB (150 mg/dia) em “pellets” de liberação lenta em uma dieta de elevado teor lipídico por 10 ou 33 semanas, após

aplicação do modelo de carcinogênese de cólon com AOM. Porém, o maior índice apoptótico foi observado somente nos animais tratados com AB durante 10 semanas. Avivi-Green et al. (2000) observaram maior indução da apoptose nos grupos submetidos ao modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH e tratados com AB (50 ou 100 mM) por instilação retal em relação ao grupo controle. Os autores associaram a atividade do AB com o aumento da expressão de genes pró-apoptóticos e com o elevado e reduzido nível de proteínas pró e anti-apoptóticas, respectivamente.

A observação de Avivi-Green et al. (2000) está de acordo com o resultado unânime de ensaios in vitro em diferentes linhagens de câncer tratadas com T ou AB: a indução da apoptose deve estar associada ao elevado e reduzido nível de proteínas pró e anti-apoptóticas, respectivamente. Esses estudos demonstraram, ainda, que a apoptose é induzida de maneira diretamente proporcional à dose e ao tempo de exposição das células à T (HEERDT et al., 1999; SCHRÖDER; MAURER, 2002; YAN; XU, 2003; WILLIAMS; COXHEAD; MATHERS, 2003; KUEFER et al., 2004).

Nesse sentido, vale ressaltar que nas condições do presente estudo, o tratamento com a T foi capaz de induzir a apoptose nas LPN em remodelação na dosagem utilizada.

Além disso, o resultado da avaliação da apoptose mostra que nos grupos submetidos ao modelo do RH (MD e TB) o número médio de CA nas LPN hepáticas GST-P positivas totais, persistentes e em remodelação foi maior do que o de seus respectivos tecidos não pré-neoplásicos (“surrounding”) e do que o grupo Normal. Por outro lado, os grupos MD e TB mostraram número médio de CA no tecido ao redor de LPN (“surrounding”) semelhante ao do grupo Normal. Esses dados

demonstram que apesar da carcinogênese ser classicamente caracterizada pela resistência à apoptose, esse tipo de morte celular torna-se mais evidente, assim como a proliferação celular, com a evolução do processo neoplásico (SCHULTE-HERMANN et al., 1998; ESPÍNDOLA et al., 2005; ONG et al., 2006).

Vale ressaltar ainda que embora o tratamento com T tenha induzido a apoptose nas LPN em remodelação, o mesmo não ocorreu no “surrounding”, sugerindo atividade específica por parte dessa substância. Alguns estudos destacaram a especificidade de indução da apoptose em tecidos transformados como uma das propriedades do AB (GÀLFI; NEOGRÀDY; CSORDÀS, 2002; RUEMMELE et al., 2003).

Existe a hipótese de que a menor oxidação do AB na carcinogênese colorretal é consequência da troca do metabolismo aeróbico para o anaeróbico no tecido neoplásico. Assim, esse acúmulo de AB no citoplasma ocasionaria uma maior concentração e disponibilidade dessa substância, que poderia indicar a maior sensibilidade das células transformadas à indução da apoptose (MCBAIN et al., 1997; SINGH; HALESTRAP; PARASKEVA, 1997).

Esse mecanismo seletivo de indução da apoptose foi relacionado ao aumento da produção de ROS em células transformadas, que não ocorreu nas não-transformadas, tratadas com HDACi (UNGERSTEDT et al., 2005). Outros autores observaram que cultura de células de câncer de cólon tornou-se sensível à apoptose, devido ao aumento da produção de ROS ocasionada pelo tratamento com AB (GIARDINA, BOULARES, INAN, 1999).

De acordo com os resultados do presente estudo, observou-se diferença entre os comprimentos dos cometas dos grupos controle positivo (grupo Normal

tratado com oxidante) e negativo (grupo Normal), demonstrando que a técnica do cometa foi adequada para quantificar danos no DNA.

Assim, ao observar diferença entre os comprimentos dos cometas dos grupos MD e Normal (controle negativo), nota-se que a ocorrência de danos no DNA, induzidos possivelmente por ROS, representa evento precoce na hepatocarcinogênese.

No entanto, não foi observada diferença entre os comprimentos dos cometas nos grupos MD e TB, indicando que a T não diminui a intensidade de danos no DNA. Essa resposta pode estar associada, ao menos em parte, à maior indução da apoptose no grupo TB. Estudos demonstraram que o aumento na geração de ROS pelas células tratadas com AB constitui mecanismo de ação dessas substâncias para induzir apoptose em cultura de células de linfoma (KURITA-OCHIAI et al., 2003), em células de câncer de cólon (GIARDINA, INAN, 1998) ou de câncer de língua (JENG et al., 2006). Outros autores associaram o tratamento de células de leucemia com butirato ao aumento da produção de ROS e indução da diferenciação celular (RICHARD, HOLLENDER, CHENAIS, 2002).

Em contrapartida, os resultados deste estudo não correspondem aos outros da literatura que utilizaram a técnica do cometa para avaliação de dano no DNA. Em células de câncer de cólon, estudos demonstraram que a administração de butirato diminuiu a intensidade de danos no DNA (ABRAHAMSE, POOL-ZOBEL, RECHKEMMER, 1999; ROSIGNOLI et al., 2001; KNOLL et al., 2005).

De qualquer forma, ainda não há um consenso a respeito do efeito do AB ou T em condições de estresse oxidativo. Assim, sugere-se que as ações quimiopreventivas da T não envolvem a diminuição da intensidade de danos no DNA em ratos submetidos ao modelo do RH.

Os resultados da avaliação da proliferação celular demonstraram que não houve diferença entre os grupos MD e TB. Esses dados estão de acordo com Caderni et al. (1998), já que estes autores observaram que o fornecimento de AB (150 mg/dia) em “pellets” de liberação lenta em uma dieta de elevado teor lipídico por 10 semanas a ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon induzido por AOM não inibiu a proliferação celular, porém aumentou o índice apoptótico.

No entanto, diversos estudos demonstraram que o butirato atuou como inibidor da proliferação de diversos tipos de linhagens celulares (KRUH, 1982; WINTERSBERGER; MUDRAK; WINTERSBERGER, 1983), em cultura de adenocarcinoma de cólon (NAKANO et al., 1997; KINOSHITA; SUZUKI; SAITO, 2002; CHEN et al., 2004), no hepatocarcinoma (SAITO et al., 1998; YAMAMOTO et al., 1998), na leucemia, no adenocarcinoma de cérvix uterina, no câncer de mama, no osteossarcoma e no carcinoma de pulmão (VECCHIA et al., 1997; GÀLFI; NEOGRÀDY; CSORDÁS, 2002; MUNSHI et al., 2005).

Autores demonstraram ainda que, em cultura de células de adenocarcinoma de cólon, o mecanismo de bloqueio do ciclo celular por parte do AB é anterior a sua metabolização à acetil-CoA, o que sugere uma ação antiproliferativa intrínseca à própria molécula do AB (LESCHELLE et al., 2000).

A ausência de atividade antiproliferativa por parte da T no presente estudo pode estar associada à existência de uma relação dose-resposta para ação dos HDACi, como o AB, na inibição da proliferação celular ou indução da apoptose. Assim, apesar dos estudos terem sido conduzidos in vitro, estes demonstraram que menores doses dessas substâncias levam à inibição da proliferação celular e assim, um efeito citostático da célula, em contraste à administração de maiores doses, que causaram indução da apoptose e efeito citotóxico celular (GABRIELLI et al., 2004).

Diante dessas observações, pode-se talvez considerar que a administração da T na dose de 200 mg/100 g p.c. foi além da dose citostática, suficiente para induzir efeito citotóxico hepático nas LPN em remodelação.

Além disso, em geral, o AB causa bloqueio do ciclo celular em G1/S, mas ocasionalmente esse pode ocorrer em G2/S (SAITO et al., 1998; GABRIELLI et al., 2004). Nesse sentido, é importante considerar que a avaliação da proliferação celular foi feita pela marcação imunoistoquímica para BrdU, que mostra apenas células na fase S do ciclo celular, fato este que pode limitar a avaliação de possível atuação antiproliferativa da T em outras fases do ciclo.

Em diversas linhagens de células neoplásicas, Joseph, Wajapeyee e Somasundaram (2005) atribuíram o bloqueio em G1/S à ausência da atividade da p53 e em G2/M, à presença desta proteína. Nesse último caso, demonstraram, ainda, que a inibição da proliferação celular pelo AB estava relacionada à acetilação da p53. Essa modificação, com conseqüente ativação da p53, também foi observada em cultura de células de melanoma por Bandyopadhyay, Mishra e Medrano (2004). Do mesmo modo, parece haver relação entre o resultado da avaliação da proliferação celular e da modulação de p53 no presente estudo.

A inativação do gene supressor de tumor p53 representa um dos eventos moleculares mais freqüentes na neoplasia humana e animal (PRIVES; HALL, 1999). A ativação de p53 pode ser modulada em 3 níveis: a) aumento da concentração da proteína em decorrência da maior tradução ou meia-vida prolongada; b) mudança da conformação da p53 para uma forma ativa; c) translocação da p53 do citoplasma para o núcleo (LIANG, CLARKE, 2001). No entanto, parece que os principais mecanismos de regulação da sua função sejam pós-traducionais, como a

fosforilação, acetilação e ubiquitinação, com conseqüente modulação da localização, estabilidade e atividade da proteína (VOUSDEN, 2002).

Em condições normais, a p53 é mantida em nível nuclear não-detectável por meio de degradação constitutiva, que lhe confere uma meia-vida de aproximadamente 20 minutos (ALVES et al., 2004; SOUSSI; LOZANO, 2005). Porém, na forma mutada, ou sob estresse genotóxico, a p53 pode ter sua meia-vida prolongada. Nesse último caso, ocorrem certas modificações pós-traducionais, como a fosforilação e a acetilação na p53 que promovem sua estabilização no núcleo (APPELLA, ANDERSON, 2001; BODE; DONG, 2004).

Assim, alguns estudos correlacionaram o estresse genotóxico e as conseqüentes alterações epigenéticas com o acúmulo nuclear da p53, detectada por imunistoquímica em fígado de ratos sacrificados logo após a administração de DEN ou fenobarbital (FINNBERG; STENIUS; HÖGBERG, 2000; FINNBERG et al., 2004).

Jing, Nan e Hu (2005) observaram no fígado marcação imunistoquímica mais pronunciada da p53, considerada mutante, no núcleo de células neoplásicas quando comparada às não-transformadas. Os autores notaram ainda presença da p53 principalmente nos maiores nódulos hepáticos. Outros ensaios demonstraram que menor número de núcleos de LPN hepáticas apresentavam marcações para p53 em relação ao HCC (NIU; LI; WANG, 2002). Em ambos os estudos, os autores sugeriram que a marcação nuclear da p53 era indicativa de transformação e malignidade.

Essa mesma conclusão foi relatada em estudo que utilizou modelo de hepatocarcinogênese em ratos induzida pela 3'-metil-4-dimetilaminoazobenzeno (3'-Me-DAB), pois os autores observaram que animais sacrificados após 6 semanas de tratamento contínuo com o carcinogênico apresentavam menos marcações de p53

nucleares nas LPN GTS-P positivas que após 23 semanas. Além disso, o estudo demonstrou que mesmo na fase inicial da hepatocarcinogênese havia mutação no gene do p53, que permitiu a observação imunoistoquímica (FU et al., 2003).

A presença da p53 no núcleo também foi demonstrada por imunoistoquímica em ratos submetidos ao modelo do RH, quando os mesmos foram sacrificados logo após o término do regime de administração do AAF. Nesse caso, a marcação da p53 foi observada somente no “surrounding”, já que devido ao caráter resistente dos hepatócitos iniciados, apenas os não-transformados foram capazes de metabolizar o carcinogênico, com conseqüente dano ao DNA e recrutamento da p53. Nesse mesmo estudo, os animais foram submetidos ao estresse genotóxico induzido por raio-X logo após o regime de administração do AAF e ao final da 6ª semana da aplicação do agente iniciante DEN. Assim, a marcação nuclear da p53 foi predominante nos ratos que receberam radiação, e que, portanto, se submeteram a estresse genotóxico agudo, tanto no “surrounding” quanto nas LPN. Nos demais animais, que foram sujeitos apenas aos procedimentos inerentes ao modelo do RH, houve acúmulo da p53 citoplasmática nas LPN ao final da 4ª e 6ª semana da iniciação (VAN GIJSSEL et al., 2000).

Todos esses dados demonstraram que devido à meia-vida curta da p53, seu acúmulo nuclear pode ser detectado por imunoistoquímica na presença de estresse genotóxico agudo (FINNBERG; STENIUS; HÖGBERG, 2000; VAN GIJSSEL et al., 2000; FINNBERG et al., 2004), modificações pós-traducionais ou formas mutantes (ALVES et al., 2004).

Além disso, Van Gijssel et al. (2000) sugerem que a marcação citoplasmática de p53 nas LPN reflete a perda da capacidade de proteção da integridade do genoma, já que as LPN não apresentaram muitas marcações nucleares de p53 logo

após o dano genotóxico agudo representado pelo raio-X. Dessa forma, os autores sugerem que essa marcação da p53 citoplasmática representa uma tentativa das LPN para responderem ao dano genético, que na incapacidade da sua translocação para o núcleo, não exerce sua função. Assim, esse acúmulo citoplasmático da p53 foi associado ao aumento dos níveis de MDM2 e bcl-2 no citoplasma, ambos relacionados ao fenótipo maligno.

Assim, os resultados da imunoistoquímica de p53 do presente estudo estão de acordo com a literatura, já que na ausência de estresse genotóxico próximo à eutanásia dos animais, não foram observadas marcações nucleares. Além disso, conforme as observações de Van Gijssel et al. (2000) e dados de ensaio conduzido previamente no nosso laboratório, as marcações citoplasmáticas da p53 estavam presentes apenas nas LPN (VAN GIJSSEL et al., 2000; MAZZANTINI, 2005). Outros estudos que observaram marcação citoplasmática para p53, em células de câncer de mama e de neuroblastoma, também associaram ao fenótipo da agressividade (MOLL, RIOU, LEVINE, 1992; MOLL et al., 1995). Autores já haviam sugerido que a carcinogênese possa resultar de um defeito na regulação da translocação da p53 para o núcleo (LIANG, CLARKE, 2001).

Os resultados deste presente estudo mostraram, ainda, que a marcação da p53 citoplasmática aumentou do “surrounding” para as LPN em remodelação, e destas para as persistentes no grupo MD, que pode representar uma falha na resposta de proteção ao genoma, conforme citado anteriormente. O mesmo não ocorreu no grupo TB, pois o tratamento com a T reduziu a porcentagem de marcação citoplasmática para p53 nas LPN persistentes.

Diversos são os fatores que podem influenciar a translocação da p53, desde associação com outras proteínas a modificações pós-traducionais, mutações, entre

outros (LIANG, CLARKE, 2001) e desta forma novas investigações são necessárias para elucidar tal fenômeno.

Com base nos dados da literatura, a maior parte demonstra que a atividade quimiopreventiva da T ou do AB é independente de p53 (YAMAMOTO et al., 1998; KOBAYASHI; TAN; FLEMING, 2003). Nos poucos casos em que há dependência, os autores relacionaram a ação do AB à acetilação da p53 (TERUI et al., 2003; BANDYOPADHYAY; MISHRA; MEDRANO, 2004; JOSEPH; WAJAPPEYEE; SOMASUNDARAM, 2005).

A ativação do NF- κ B está presente de forma aberrante em diversos tipos de câncer. Na hepatocarcinogênese, sua ativação ocorre em fases precoces e contribui provavelmente para com a transformação maligna (LIU et al., 2002; ESPÍNDOLA et al., 2005).

Recentes publicações, incluindo as de nosso laboratório, observaram ativação aumentada desse fator de transcrição em fases iniciais do modelo do RH (CARRASCO-LEGLEU et al., 2004; ESPÍNDOLA et al., 2005; MAZZANTINI, 2005). Conforme esperado, notou-se neste estudo que houve ativação de NF- κ B nos grupos submetidos ao modelo do RH (MD e TB) em relação ao Normal.

Porém, de forma inédita, o presente estudo mostrou que o tratamento com T inibiu a ativação do NF- κ B, resultado oposto ao observado em ensaio in vitro, no qual houve aumento da ativação do NF- κ B após tratamento com T em linhagem de câncer de próstata (FLORYK; HUBERMAN, 2005). Da mesma forma, a maior parte dos estudos com AB demonstra aumento da ativação, da atividade e da transcrição dependente desse fator de transcrição em linhagens de câncer de pulmão de células não-pequenas e leucemia.

Em todas essas investigações com AB, e incluindo o estudo com T mencionado, os autores relacionaram os efeitos das substâncias as suas propriedades como HDACi, que poderiam favorecer a transcrição de p65 e sua atividade como fator de transcrição (ADAM et al., 2003; MAYO et al., 2003; GAO et al., 2004; DENLINGER et al., 2004; DENLINGER; BRIAN; RUNDALL; JONES, 2005; FLORYK; HUBERMAN, 2005). No entanto, Floryk e Huberman (2005) caracterizaram essa ação da T como responsável pelo aumento da diferenciação celular, ao contrário dos demais autores, que relacionaram o aumento da ativação de NF- κ B à resistência ou menor indução da apoptose pelo tratamento com AB (MAYO et al., 2003; GAO et al., 2004; DENLINGER et al., 2004; DENLINGER; BRIAN; RUNDALL; JONES, 2005).

Deste modo, o mecanismo pelo qual o NF- κ B contribui para a transformação neoplásica é, em parte, decorrente de seu papel como fator de transcrição de vários genes anti-apoptóticos (ARSURA; CAVIN, 2005). Nesse sentido, Liu et al. (2002) associaram o caráter maligno com maior ativação e atividade de NF- κ B, já que este perfil estava presente nos hepatocarcinomas e não nos tecidos não-transformados a seu redor. Em fases precoces da hepatocarcinogênese, sugeriu-se que devido à ativação de NF- κ B houve indução da proliferação celular e inibição da apoptose. Esses eventos podem ter determinado o rápido crescimento de LPN, o que representa um pré-requisito para a evolução a hepatocarcinomas (SIMILE et al., 2005). Nesse sentido, estudos recentes têm demonstrado que a utilização de inibidores de NF- κ B podem ser úteis na quimioprevenção e tratamento do hepatocarcinoma (ARSURA; CAVIN, 2005).

Assim, os resultados deste ensaio confirmam dados dos poucos autores que observaram inibição da ativação e atividade de NF- κ B pelo tratamento com AB,

embora em linhagens de carcinoma de cólon. Nesses casos, relacionaram os efeitos dessa substância com a redução da degradação do I κ B α pelo sistema proteassomo (YIN; LAEVSKY; GIARDINA, 2001; PLACE; NOONAN; GIARDINA, 2005).

Alguns fatores podem ter influenciado a resposta do NF- κ B ao tratamento com T ou AB, incluindo a natureza in vivo do presente estudo, e não in vitro como os demais citados, bem como as diferenças em relação aos tempos de exposição às substâncias. Assim, vale destacar que as investigações que demonstraram aumento da ativação do NF- κ B haviam tratado as células com T ou AB por curto período de horas, enquanto aqueles que revelaram inibição desse fator de transcrição, incluindo este experimento, administraram a substância cronicamente.

Numerosos estudos apontam que o AB, metabólito da T, atua em concentrações milimolares na inibição da maioria das enzimas HDAC (MARKS; RICHON; RIFKIND, 2000; DAVIE, 2003). Porém, o modo pelo qual o AB inibe a atividade da HDAC permanece desconhecido, mas sabe-se que a inibição é reversível (GIBSON, 2000). Existem propostas de que duas moléculas do AB poderiam ocupar o sítio hidrofóbico da enzima de forma a inibi-la. Outras hipóteses sugerem que o AB atua por mecanismo de inibição não-competitiva (DAVIE, 2003).

Assim, com a atividade de certas HDACs inibida, há recrutamento das HATs, que resulta em hiperacetilação de histonas e de um grande grupo de proteínas não histonas (MCLAUGHLIN; LA THANGUE, 2004). Descreve-se que a acetilação de histonas está associada à ativação da transcrição (GRUNSTEIN, 1997; STRUHL, 1998).

De acordo com o resultado obtido da avaliação da acetilação de H3K9 no presente estudo, sugere-se que o grupo Normal apresentou maior grau de acetilação de H3K9 em relação aos submetidos ao modelo do RH (MD e TB). Esses

dados são compatíveis com a literatura, uma vez que a desacetilação de histonas constitui evento precoce em diversos tipos de câncer (FRAGA et al., 2005) que, no entanto, não havia sido observado na hepatocarcinogênese.

De forma interessante e inédita, observou-se ainda que o grupo TB tendeu a aumentar o grau de acetilação de H3K9, em relação ao MD, em um modelo in vivo. Isso indica que T pode ter ocasionado a inibição das HDAC's, provavelmente por meio da sua metabolização à AB, permitindo maior atividade de HAT's e consequentemente maior acetilação de histonas.

Nesse contexto, o presente estudo mostra de forma inédita a atividade quimiopreventiva da T na hepatocarcinogênese em ratos, que parece estar envolvida com a inibição das LPN persistentes, indução da remodelação, indução da apoptose nas LPN em remodelação, indução da acetilação de H3K9, inibição da ativação do NF- κ B e normalização da função de p53.

6 CONCLUSÕES

- A administração da T durante 8 semanas consecutivas e diariamente, abrangendo as etapas de iniciação e seleção/promoção, resultou em atividade quimiopreventiva da hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH;
- A atividade quimiopreventiva da T parece estar relacionada à inibição de LPN persistentes, à indução da remodelação e da apoptose nas LPN em remodelação, à indução da acetilação de H3K9, à inibição da ativação do NF- κ B e à normalização da função de p53;
- A atividade quimiopreventiva da T não parece estar relacionada à inibição da proliferação celular e de danos no DNA;
- A persistência de LPN parece envolver alterações na função de p53.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, E.; QUIVY, V.; BEX, F.; CHARIOT, A.; COLLETTE, Y.; VANHULLE, C.; SCHOONBROODT, S.; GOFFIN, V.; NGUYÊN, T.L.; GLOIRE, G.; CARRARD, G.; FRIGUET, B.; LAUNOIT, I.; BURNY, A.; BOURS, V.; PIETTE, J.; LINT, L. Potentiation of tumor necrosis factor-induced NF- κ B activation by deacetylase inhibitors is associated with a delayed cytoplasmic reappearance of I κ B α . **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, n. 17, p. 6200–6209, ago. 2003.
- AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, n. 10, p. 1397-1421, mai. 2006.
- ALCANTARA, E.N.; SPECKMANN, E.W. Diet, nutrition, and cancer. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 29, n. 9, p. 1035-1047, set. 2006.
- ALVES, V.A.F.; NITA, M.E.; CARRILHO, F.J.; ONO-NITA, S.K.; WAKAMATSU, A.; LEHRBACH, D.M.; CARVALHO, M.F.P.; DE MELLO, E.S.; GAYOTTO, E.C.C.; DA SILVA, L.C. p53 immunostaining pattern in brazilian patients with hepatocellular carcinoma. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 46, n. 1, p. 25-31, jan.-fev. 2004.
- AMBRAHAMSE, S.L.; POOL-ZOBEL, B.L.; RECHKEMMER, G. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis*, v. 20, n. 4, p. 629-634, abr. 1999.
- AMES, B.N.; GOLD, L.S.; WILLETT, W.C. The causes and prevention of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, n. 12, p. 5258-5265, jun. 1995.
- APPELLA, E., ANDERSON, C.W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 10, p. 2764-2772, mai. 2001.
- ARSURA, M.; CAVIN, L.G. Nuclear factor-kappa B and liver carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v. 229, n. 2, p. 157-169, nov. 2005.
- AVIVI-GREEN, C.; POLAK-CHARCON, S.; MADAR, Z.; SCHWARTZ, B. Apoptosis cascade proteins are regulated in vivo by high intracolonic butyrate concentration: correlation with colon cancer inhibition. **Oncol. Res.**, v. 12, n. 2, p. 83-95, 2000.

- BAI, L.; MERCHANT, J.L. ZBP-89 Promotes growth arrest through stabilization of p53. **Mol. Cell. Biol.**, v. 21, n. 14, p. 4670–4683, jul. 2001.
- BANDYOPADHYAY, D.; MISHRA, A.; MEDRANO, E.E. Overexpression of histone deacetylase 1 confers resistance to sodium butyrate-mediated apoptosis in melanoma cells through a p53-mediated pathway. **Cancer Res.**, v. 64, n. 21, p. 7706–7710, nov. 2004.
- BANNASCH, P., HAERTEL, T., SU, Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. **Toxicol. Pathol.**, v. 31, n. 1, p. 134-139, fev. 2003.
- BANNASCH, P.; NEHRBASS, D.; KOPP-SCHNEIDER, A. Significance of hepatic preneoplasia for cancer chemoprevention. **IARC Sci. Publ.**, v. 154, p. 223-240, 2001.
- BANNASCH, P. Pre-neoplastic lesions as end points in carcinogenesis testing. I. Hepatic Preneoplasia. **Carcinogenesis**, v. 7, n. 5, p. 689-695, mai. 1986.
- BANNASCH, P.; ZERBAN, H. Tumors of the liver. In: TURUSOV, V.S.; MOHR, U. **Pathology of Tumors in laboratory Animals**. v. 1, n. 99. Lyons: IARC Sci. Publ., 1990. p.199-240.
- BEAUVIEUX, M.; TISSIER, P.; GIN, H.; CANIONI, P.; GALLIS, J. Butyrate impairs energy metabolism in isolated perfused liver of fed rats. **J. Nutr.**, v. 131, n. 7, p. 1986–1992, jul. 2001.
- BELOBRAJDIC, D.P.; MCINTOSH, G.H. Dietary butyrate inhibits NMU-induced mammary cancer in rats. **Nutr. Cancer**, v. 36, n. 2, p. 217-23, 2000.
- BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects Med.**, v. 21, n. 6, p. 167-223, dez. 2000.
- BIRT, D.F. Fat and calorie effects on carcinogenesis at sites other than the mammary gland. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 45, n. 1, p. 203-209, jan. 1987.
- BODE, A.M.; DONG, Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 10, p. 793-805, out. 2004.

- BRALET, M. P.; PICHARD, V.; FERRY, N. Demonstration of direct lineage between hepatocytes and hepatocellular carcinoma in diethylnitrosamine-treated rats. **Hepatology**, v. 36, n. 3, p. 623-630, set. 2002.
- CADERNI, G.; LUCERI, C.; DE FILIPPO, C.; SALVADORI, M.; GIANNINI, A.; TESSITORE, L.; DOLARA, P. Slow-release pellets of sodium butyrate do not modify azoxymethane (AOM) induced intestinal carcinogenesis in F344 rats. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 3, p. 525-527, mar. 2001.
- CADERNI, G.; LUCERI, C.; LANCIONI, L.; TESSITORE, L.; DOLARA, P. Slow-release pellets of sodium butyrate increase apoptosis in the colon of rats treated with azoxymethane, without affecting aberrant crypt foci and colonic proliferation. **Nutr. Cancer**, v. 30, n. 3, p. 175-181, 1998.
- CABANNES, E.; KHAN, G.; AILLET, F.; JARRETT, R.F.; HAY, R.T. Mutations in the $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. **Oncogene**, v. 18, n. 20, p. 3063-3070, mai. 1999.
- CARBONE, M.; KLEIN, G.; GRUBER, J.; WONG, M. Modern criteria to establish human cancer etiology. **Cancer Res.**, v. 64, n. 15, p. 5518–5524, ago. 2004.
- CARRASCO-LEGLEU, C.E.; MÁRQUEZ-ROSADO, L.; FATTEL-FAZENDA, S.; ARCE-POPOCA, E.; PÉREZ-CARREÓN, J.; VILLA-TREVINÑO, S. Chemoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester on promotion in a medium-term rat hepatocarcinogenesis assay. **Int. J. Cancer**, v. 108, n. 4, p. 488-492, fev. 2004.
- CASTEDO, M.; PERFETTINI, J.L.; ROUMIER, T.; VALENT, A.; RASLOVA, H.; YAKUSHIJIN, K.; HORNE, D.; FEUNTEUN, J.; LENOIR, G.; MEDEMA, R.; VAINCHENKER, W.; KROEMER, G. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. **Oncogene**, v. 23, n. 25, p.4362-4370, mai, 2004.
- CHEN, C.J.; YU, M.W.; LIAW, Y.F. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 12, n. 9-10, p. S294-S308, out. 1997.
- CHEN, C.; KONG, A.N. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 26, n. 6, p. 318-326, jun. 2005.

- CHENG, B.Q.; TRIMBLE, R.P.; ILLMAN, R.J.; STONE, B.A.; TOPPING, D.L. Comparative effects of dietary wheat bran and its morphological components (aleurone and pericarp-seed coat) on volatile fatty acid concentrations in the rat. **Br. J. Nutr.**, v. 57, n. 1, p. 69–76, jan. 1987.
- CHEN, L., GREENE, W.C. Shaping the nuclear action of NF- κ B. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 5, p. 392-341, mai. 2004.
- CHEN, L.; MU, Y.; GREENE, W.C. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- κ B. **EMBO J.**, v. 21, n. 23, p. 6539–6548, dez. 2002.
- CHEN, L.W.; FISCHLE, W.; VERDIN, E.; GREENE, W.C. Duration of nuclear NF-kappa B action regulated by reversible acetylation. **Science**, v. 293, n. 5535, p. 1653–1657, ago. 2001.
- CHEN, Y.X.; FANG, J.Y.; ZHU, H.Y.; LU, R.; CHENG, Z.H.; QIU, D.K. Histone acetylation regulates p21WAF1 expression in human colon cancer cell lines. **World J. Gastroenterol.**, v. 10, n. 18, p. 2643-2646, set. 2004.
- CHEN, Z.X.; BREITMAN, T.R. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. **Cancer Res.**, v. 54, n. 13, p. 3494-3499, jul. 1994.
- CHUNG, D. Histone modification: the 'next wave' in cancer therapeutics. **Trends Mol. Med.**, v.8, n. 4, p. S10-11, 2002.
- COATES, P.J.; LORIMORE, S.A.; WRIGHT, E.G. Cell and tissue responses to genotoxic stress. **J. Pathol.**, v. 205, n. 2, p. 221–235, jan. 2005.
- COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol. Biotechnol.**, v. 26, n. 3, p. 249-261, mar. 2004.
- CONLEY, B.A.; EGORIN, M.J.; TAIT, N.; ROSEN, D.M.; SAUSVILLE, E.A.; DOVER, G.; FRAM, R.J.; VAN ECHO, D.A. Phase I study of the orally administered butyrate prodrug, tributyrin, in patients with solid tumors. **Clin. Cancer Res.**, v. 4, n. 3, p. 629-634, mar. 1998.

- CUMMINGS, J.H.; POMARE, E.W.; BRANCH, W.J.; NAYLOR, C.P.E.; MACFARLANE, G.T. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut**, v. 28, n. 10, p. 1221–1227, out. 1987.
- CUMMINGS, J.H. Short chain fatty acids in human colon. **Gut**, v. 22, n. 9, p. 763-779, set. 1981.
- DANIEL, P.; BRAZIER, M.; CERUTTI, I.; PIERI, F.; TARDIVEL, I; DESMET, G.; BAILLET, J.; CHANY, C. Pharmacokinetic study of butyric acid administered in vivo as sodium and arginine butyrate salts. **Clin. Chim. Acta**, v. 181, n. 3, p. 255-263, mai. 1989.
- DAVIE, J.R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **J. Nutr.**, v. 133, n. 7, p. 2485S–2493S, jul. 2003.
- DAVIS, C.D.; MILNER, J. Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. **Mutat. Res.**, v. 551, n. 1-2, p. 51-64, jul. 2004.
- DE FLORA S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat. Res.**, v. 591, n. 1-2, p. 8-15, dez. 2005.
- DE MIGLIO, M.R.; SIMILE, M.M.; MURONI, M.R.; CALVISI, D.F.; VIRDIS, P.; ASARA, G.; FRAU, M.; BOSINCO, G.M.; SEDDAIU, M.A.; DAINO, L.; FEO, F.; PASCALE, R.M. Phenotypic reversion of rat neoplastic liver nodules is under genetic control. **Int. J. Cancer**, v. 105, n. 1, p. 70-75, mai. 2003.
- DEMIGNÉ, C.; YACOUB, C.; RKMCSY, C.; FAFOURNOUX, P. Propionate and butyrate metabolism in rat or sheep hepatocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, n. 875, n. 3, p. 535-542, fev. 1986.
- DENLINGER, C.E.; KELLER, M.D.; MAYO, M.W.; BROAD, R.M.; JONES, D.R. Combined proteasome and histone deacetylase inhibition in non-small cell lung cancer. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 127, n. 4, p. 1078-1086, abr. 2004.
- DENLINGER, C.E.; RUNDALL, B.K.; JONES, D.R. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and histone deacetylase activity induces apoptosis in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 130, n. 5, p. 1422-1429, nov. 2005.

- DESCHNER, E.E.; RUPERTO, J.F.; LUPTON, J.R.; NEWMARK, H.L. Dietary butyrate (tributylin) does not enhance AOM-induced colon tumorigenesis. **Cancer Lett.**, v. 52, n. 1, p. 79-82, jun. 1990.
- DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 66, n. 6, p. 1191-1308, jun. 1981.
- DOLL, R. Symposium on "Diet and cancer". **Proc. Nutr. Soc.**, v. 49, p. 119-131, 1990.
- DRAGAN, Y.P.; CAMPBELL, H.A.; XU, X.H.; PITOT, H.C. Quantitative stereological studies of a "selection" protocol of hepatocarcinogenesis following initiation in neonatal male and female rats. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 1, p. 149-158, jan. 1997.
- DREYFUS, D.H.; NAGASAWA, M.; GELFAND, E.W.; GHODA, L.Y. Modulation of p53 activity by I κ B α : Evidence suggesting a common phylogeny between NF- κ B and p53 transcription factors. **BMC Immunol.**, v. 6, jun. 2005.
- DRUESNE, N.; PAGNIEZ, A.; MAYEUR, C.; THOMAS, M.; CHERBUY, C.; DUEE, P.H.; MARTEL, P.; CHAUMONTET, C. Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 7, p. 1227-1236, jul. 2004.
- DRUMMOND, D.C.; NOBLE, C.O.; KIRPOTIN, D.B.; GUO, Z.; SCOTT, G.K.; BENZ, C.C. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 495-528, 2005.
- EDELMAN, M.J.; BAUER, K.; KHANWANI, S.; TAIT, N.; TREPEL, J.; KARP, J.; NEMIEBOKA, N.; CHUNG, E.J.; VAN ECHO, D. Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 51, n. 5, p. 439-444, mai. 2003.
- EGORIN, M.J.; YUAN, Z.M.; SENTZ, D.L.; PLAISANCE, K.; EISEMAN, J.L. Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 43, n. 6, p. 445-453, 1999.
- EMANUELE, S.; DÁNNEO, A.; BELLAVIA, G.; VASSALO, B.; LAURICELLA, M.; DE BLASIO, A.; VENTO, R.; TESORIERE, G. Sodium butyrate induces apoptosis in

human hepatoma cells by a mitochondria/caspase pathway, associated with degradation of β -catenin, pRb and Bcl-XL. **Eur. J. Cancer**, v. 40, n. 9, p. 1441-1452, jun. 2004.

ESPÍNDOLA, R.M.; MAZZANTINI, R.P.; ONG, T.P.; DE CONTI, A.; HEIDOR, R.; MORENO, F.S. Geranylgeraniol and beta-ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kappa B activation. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 6, p. 1091-1099, jun. 2005.

FABBRO, M.; HENDERSON, B.R. Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. **Exp. Cell Res.**, v. 282, n. 2, p. 59-69, jan. 2003.

FARBER, E. Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. **Cancer Res.**, v. 55, n. 17, p. 3759-3762, set. 1995.

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

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

FARBER, E.; SARMA, D.S.R. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Lab. Invest.**, v. 56, n. 1, p. 4-22, jan. 1987.

FARBER, E. The sequential analysis of liver cancer induction. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 605, n. 2, p. 149-166, mai. 1980.

FEINBERG, A.P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143-153, fev. 2004.

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

FEO, F.; PASCALE, R.M.; SIMILE, M.M.; DE MIGLIO, M.R.; MURONI, M.R.; CALVISI, D.F. Genetic alterations in liver carcinogenesis: implications for new preventive and therapeutic strategies. **Crit. Rev. Oncog.**, v. 11, n. 1, p. 19-62, 2000.

- FINNBERG, N.; SILINS, I.; STENIUS, U.; HÖGBERG, J. Characterizing the role of MDM2 in diethylnitrosamine induced acute liver damage and development of pre-neoplastic lesions. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 1, p. 113-122, jan. 2004.
- FINNBERG, N.; STENIUS, U.; HÖGBERG, J. Xenobiotics modulate the p53 response to DNA damage in preneoplastic enzyme-altered foci in rat liver; effects of diethylnitrosamine and phenobarbital. **Toxicol. Sci.**, v. 54, n. 1, p. 95–103, mai. 2000.
- FISCHLE, W.; WANG, Y.; ALLIS, C.D. Histone and chromatin cross-talk. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 15, n. 2, p. 172-183, abr. 2003.
- FITCH, M.D.; FLEMING, S.E. Metabolism of short-chain fatty acids by rat colonic mucosa in vivo. **Am. J. Physio. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 277, p. G31–G40, jul. 1999.
- FLORYK, D.; HUBERMAN, E. Differentiation of androgen-independent prostate cancer PC-3 cells is associated with increased nuclear factor- κ B activity. **Cancer Res.**, v. 65, n. 24, p. 11588-11596, dez. 2005.
- 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.
- FORMAN, M.R.; HURSTING, S.D.; UMAR, A.; BARRETT, J.C. Nutrition and cancer prevention: A multidisciplinary perspective on human trials. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 24, p. 223–254, 2004.
- FRAGA, M.F.; BALLESTAR, E.; VILLAR-GAREA, A.; BOIX-CHORNET, M.; ESPADA, J.; SCHOTTA, G.; BONALDI, T.; HAYDON, C.; ROPERO, S.; PETRIE, K.; IYER, N.G.; PEREZ-ROSADO, A.; CALVO, E.; LOPEZ, J.A.; CANO, A.; CALASANZ, M.J.; COLOMER, D.; PIRIS, M.A.; AHN, N.; IMHOF, A.; CALDAS, C.; JENUWEIN, T.; ESTELLER, M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. **Nat. Genet.**, v. 37, n. 4, p. 391-400, abr. 2005.
- FREEMAN, H.J. Effects of differing concentrations of sodium butyrate on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat intestinal neoplasia. **Gastroenterology**, v. 91, n. 3, p. 596-602, set. 1986.

- FRIEDBERG, E.C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 436–440, jan. 2003.
- FU, Y.; DENG, W.; KAWARADA, Y.; KAWAGOE, M.; MA, Y.Z.; LI, X.; GUO, N.; KAMEDA, T.; TERADA, K.; SUGIYAMA, T. Mutation and expression of the p53 gene during chemical hepatocarcinogenesis in F344 rats. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1628, n. 1, p. 40-49, jul. 2003.
- GABRIELLI, B.; WARRENER, R.; BURGESS, A.; BEAMISH, H. Defining the chemotherapeutic targets of histone deacetylase inhibitors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1030, p. 627-635, dez. 2004.
- GÁLFI, P.; NEOGRÁDY, Z.; CSORDÁS, A. Apoptosis sensitivity is not correlated with sensitivity to proliferation inhibition by the histone deacetylase inhibitors butyrate and TSA. **Cancer Lett.**, v. 188, n. 1-2, p. 141-152, dez. 2002.
- GAO, N.; DAI, Y.; RAHMANI, M.; DENT, P.; GRANT, S. Contribution of disruption of the Nuclear Factor- κ B pathway to induction of apoptosis in human leukemia cells by histone deacetylase inhibitors and flavopiridol. **Mol. Pharmacol.**, v. 66, n. 4, p. 956–963, out. 2004.
- GIARDINA, C.; BOULARES, H.; INAN, M.S. NSAIDs and butyrate sensitize a human colorectal cancer cell line to TNF- α and Fas ligation: the role of reactive oxygen species. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1448, n. 3, p. 425-438, jan. 1999.
- GIARDINA, C.; INAN, M.S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, short-chain fatty acids, and reactive oxygen metabolism in human colorectal cancer cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1401, n. 3, p. 277-288, mar. 1998.
- GIBSON, P.R. The intracellular target of butyrate's actions: HDAC or HDON'T? **Gut**, v. 46, n. 4, p.447-448, abr. 2000.
- GILMORE, A.P. Anoikis. **Cell Death Differ.**, v. 12, n. 2, p.1473-1477, nov., 2005.
- GIOIELLI, L.A. Lipídios estruturados. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002, p. 457-465.

- GLAUERT, H.P. Dietary fat, gene expression, and carcinogenesis. In: BERDANIER, C.D.; HARGROVE, J.L. **Nutrition and gene expression**. Flórida: CRC Press, 1993, p. 247-268.
- GOLDSWORTHY, T.L.; FRANSSON-STEEN, R.; MARONPOT, R.R. Importance of and approaches to quantification of hepatocyte apoptosis. **Toxicol. Pathol.**, v. 24, n. 1, p. 24-35, jan-fev. 1996.
- GRASL-KRAUPP, B.; BURSCH, W.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; WAGNER, A.; LAUER, B.; SHULTE-HERMANN, R. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 21, p. 9995-9999, out. 1994.
- GREAVES, M. Cancer causation: the Darwinian downside of past success? **Lancet Oncol.**, v. 3, n. 4, p. 244–251, abr. 2002.
- GREENWALD, P. Cancer chemoprevention. **BMJ**, v. 324, n. 7339, p. 714-718, mar. 2002.
- GRUNSTEIN, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. **Nature**, v. 389, n. 6649, p. 349-352, set. 1997.
- GU, W.; ROEDER, R.G. Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 595–606, ago. 1997.
- HAGUE, A.; BUTT, A.J.; PARASKEVA, C. The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? **Proc. Nutr. Soc.**, v. 55, n. 3, p. 937-943, nov. 1996.
- HAGUE, A.; DÍAZ, G.D.; HICKS, D.J.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C.; PARASKEVA, C. Bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis. **Int. J. Cancer**, v. 72, n. 5, p. 898–905, set. 1997.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.
- HEERDT, B.G.; HOUSTON, M.A.; ANTHONY, G.M.; AUGENLICHT, L.H. Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a

- triglyceride analogue of the short-chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity. **Cancer Res.**, v. 59, n. 7, p. 1584–1591, abr. 1999.
- HEERDT, B.G.; HOUSTON, M.A.; AUGENLICHT, L.H. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. **Cancer Res.**, v. 54, n. 12, p. 3288-3293, jun. 1994.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, out. 2000.
- HENNINGSSON, A.M.; BJÖRCK, I.M.; NYMAN, E.M. Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats. **J. Nutr.**, v. 132, n. 10, p. 3098-3104, out. 2002.
- HERNANDEZ, A.; THOMAS, R.; SMITH, F.; SANDBERG, J.; KIM, S.; CHUNG, D.H.; EVERS, B.M. Butyrate sensitizes human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. **Surgery**, v. 130, n. 2, p. 265-272, ago. 2001.
- HIGGINS, G.M.; ANDERSON, R.M. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Arch. Pathol.**, v. 12, p. 186-202, 1931.
- HOFSETH, L.J.; HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. p53: 25 years after its discovery. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 25, n. 4, p. 177-181, abr. 2004.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, F.A. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 75, n. 5, p. 734-738, mai. 1981.
- HURSTING, S.D.; SLAGA, T.J.; FISCHER, S.M.; DIGIOVANNI, J.; PHANG, J.M. Mechanism-based cancer prevention approaches: targets, examples, and the use of transgenic mice. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, n. 3, p. 215-225, fev. 1999.
- IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277-288, abr. 2002.
- 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, n. 3, p. 545-551, mar. 1997.

ITO, N.; IMAIDA, K.; ASAMOTO, M.; SHIRAI, T. Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats. **Mutat. Res.**, v. 462, n. 2-3, p. 209–217, abr. 2000.

ITO, N.; TAMANO, S.; SHIRAI, T. A medium-term rat liver bioassay for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals. **Cancer Sci.**, v. 94, n. 1, p. 3-8, jan. 2003.

ITTRICH, C.; DEML, E.; OESTERLE, D.; KÜTTLER, K.; MELLERT, W.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; ENZMANN, H.; SCHLADT, L.; BANNASCH, P.; HAERTEL, T.; MÖNNIKES, O.; SCHWARZ, M.; KOPP-SCHNEIDER, A. Prevalidation of a rat liver foci bioassay (RLFB) based on results from 1600 rats: A Study Report. **Toxicol. Pathol.**, v. 31, n. 1, p. 60-79, jan.-fev. 2003.

JENG, J.H.; KUO, M.Y.; LEE, P.H.; WANG, Y.J.; LEE, M.Y.; LEE, J.J.; LIN, B.R.; TAI, T.F.; CHANG, M.C. Toxic and metabolic effect of sodium butyrate on SAS tongue cancer cells: role of cell cycle deregulation and redox changes. **Toxicology**, v. 223, n. 3, p. 235-247, jun. 2006.

JEONG, J.; ADAMSON, L.K.; HATAM, R.; GREENHALGH, D.G.; CHO, K. Alterations in the expression and modification of histones in the liver after injury. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 75, n. 3, p. 256-264, dez. 2003.

JING, Z.; NAN, K.; HU, M. Cell proliferation, apoptosis and the related regulators p27, p53 expression in hepatocellular carcinoma. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 13, p. 1910-1916, abr. 2005.

JONES, P.A. Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 983, p. 213-219, mar. 2003.

JOSEPH, J.; WAJAPYEE, N.; SOMASUNDARAM, K. Role of p53 status in chemosensitivity determination of cancer cells against histone deacetylase inhibitor sodium butyrate. **Int. J. Cancer**, v. 115, n. 1, p. 11–18, mai. 2005.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo:Santos, 1983.

- KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, mai. 2006.
- KAWAI, H.; LI, H.; AVRAHAM, S.; JIANG, S.; AVRAHAM, H.K. Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha. **Int J Cancer**, v. 107, n. 3, p. 353-358, nov., 2003.
- KELLOFF, G.J.; BOONE, C.W.; STEELE, V.E.; FAY, J.R.; LUBET, R.A.; CROWELL, J.A.; SIGMAN, C.C. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. **J. Cell. Biochem. Suppl.**, v. 20, p. 1-24, 1994.
- KELLOFF, G.J.; CROWELL, J.A.; STEELE, V.E.; LUBET, R.A.; MALONE, W.A.; BOONE, C.W.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E.T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J.A.; ALI, I.; VINER, J.L.; SIGMAN, C.C. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. **J. Nutr.**, v. 130, n. 2S, p. 467S-471S, fev. 2000.
- KIERNAN, R.; BRES, V.; NG, R.W.; COUDART, M.P.; EL MESSAOUDI, S.; SARDET, C.; JIN, D.Y.; EMILIANI, S.; BENKIRANE, M. Post-activation turn-off of NF- κ B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 4, p. 2758-2766, jan. 2003.
- KINOSHITA, M.; SUZUKI, Y.; SAITO, Y. Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPAR γ activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 293, n. 2, p. 827-831, mai. 2002.
- KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 19, n. 10, p. 543-555, out. 2000.
- KLIGERMAN, J. Estimativas sobre a incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2002. **Rev. Bra. Cancerologia**, v. 48, p. 175-179, 2002.
- KNOLL, N.; RUHE, C.; VEERIAH, S.; SAUER, J.; GLEI, M.; GALLAGHER, E.P.; POOL-ZOBEL, B.L. Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate. **Toxicol Sci.**, v. 86, n. 1, p. 27-35, jul. 2005.

- KOBAYASHI, H.; TAN, E.M.; FLEMING, S.E. Sodium butyrate inhibits cell growth and stimulates p21WAF1/CIP1 protein in human colonic adenocarcinoma cells independently of p53 status. **Nutr. Cancer**, v. 46, n. 2, p. 202–211, 2003.
- KONDO, Y.; KANZAWA, T.; SAWAYA, R.; KONDO, S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 9, p. 726-734, set. 2005.
- KONG, T.A.; YU, R.; HEBBAR, V.; CHEN, C.; OWUOR, E.; HU, R.; EE, R.; MANDLEKAR, S. Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. **Mutat. Res.**, v. 480-481, p. 231-241, set. 2001.
- KROEMER, G.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M.E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M.V.; MALORNI, W.; KNIGHT, R.A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G. Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ**, v. 12, n. 2, p. 1463-1467, nov. 2005.
- KRUH, J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 42, n. 2, p. 65-82, fev. 1982.
- KUEFER, R.; HOFER, M.D.; ALTUG, V.; ZORN, C.; GENZE, F.; KUNZI-RAPP, K.; HAUTMANN, R.E.; GSCHWEND, J.E. Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. **British J. Cancer**, v. 90, n. 2, p. 535-541, jan. 2004.
- KURITA-OCHIAI, T.; AMANO, S.; FUKUSHIMA, K.; OCHIAI, K. Cellular events involved in butyric acid-induced T cell apoptosis. **J. Immunol.**, v. 171, n. 7, p. 3576-3584, out. 2003.
- LACONI, E.; PANI, P.; FARBER, E. The resistance phenotype in the development and treatment of cancer. **Lancet Oncol.**, v. 1, p. 235-241, dez. 2000.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, ago. 1970.
- LAI, D.T.; MACKENZIE, A.D.; O'CONNOR, C.J.; TURNER, K.W. Hydrolysis characteristics of bovine milk fat and monoacid triglycerides mediated by pregastric lipase from goats and kids. **J. Dairy Sci.**, v. 80, n. 10, p. 2249-2257, out. 1997.

- LESCELLE, X.; DELPAL, S.; GOUBERN, M.; BLOTTIÈRE, H.M.; BLACHIER, F. Butyrate metabolism upstream and downstream acetyl-CoA synthesis and growth control of human colon carcinoma cells. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 21, p. 6435-6442, nov. 2000.
- LIANG, S.H.; CLARKE, M.F. Regulation of p53 localization. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 10, p. 2779-2783, mai. 2001.
- LIN, A.; KARIN, M. NF- κ B in cancer: a marked target. **Semin Cancer Biol.**, v. 13, n. 2, p. 107–114, abr. 2003.
- LIU, P.; KIMMOUN, E.; LEGRAND, A.; SAUVANET, A.; DEGOTT, C.; LARDEUX, B.; BERNUAU, D. Activation of NF-kappa B, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas. **J. Hepatology**, v. 37, n. 1, p. 63–71, jul. 2002.
- LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J. Nutr.**, v. 134, n. 12, p. 3479S-3485S, dez. 2004.
- LLOVET, J.M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1907-1917, dez. 2003.
- LOEB, L.A.; LOEB, K.R.; ANDERSON, J.P. Multiple mutations and cancer. **Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 3, p. 776-781, fev. 2003.
- LOLLINI, P.L.; CAVALLO, F.; NANNI, P.; FORNI, G. Vaccines for tumour prevention. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 3, p. 204-216, mar. 2006.
- LUCH, A. Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 2, p. 113-25, fev. 2005.
- LUO, J.; LI, M.; TANG, Y.; LASZKOWSKA, M.; ROEDER, R.G.; GU, W. Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. **Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, n. 8, fev. 2004.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 1, n. 3, p. 222-231, mar. 2001.

- MANJESHWAR, S.; RAO, P.M.; RAJALAKSHMI, S.; SARMA, D.S. The regulation of ribonucleoside diphosphate reductase by the tumor promoter orotic acid in normal rat liver in vivo. **Mol. Carcinog.**, v. 24, n. 3, p. 188-196, mar. 1999.
- MARKS, P.A.; RICHON, V.M.; RIFKIND, R.A. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 92, n. 15, p. 1210-1216, ago. 2000.
- MARKS, P.A.; RIFKIND, R.A.; RICHON, V.M.; BRESLOW, R.; MILLER, T.; KELLY, W.K. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. **Nat. Rev. Cancer**, v. 1, n. 3, p. 194-202, dez. 2001.
- MARTINEZ, G.R.; LOUREIRO, A.P.M.; MARQUES, S.A.; MIYAMOTO, S.; YAMAGUCHI, L.F.; ONUKI, J.; ALMEIDA, E.A.; GARCIA, C.C.M.; BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutat. Res.**, v. 544, n. 2-3, p. 115-127, nov. 2003.
- MAYO, M.W.; DENLINGER, C.E.; BROAD, R.M.; YEUNG, F.; REILLY, E.T.; SHI, Y.; JONES, D.R. Ineffectiveness of histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis involves the transcriptional activation of NF- κ B through the Akt Pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 21, p. 18980-18989, mai. 2003.
- 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.
- MCBAIN, J.A.; EASTMAN, A.; NOBEL, S.; MUELLER, G.C. Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, n. 9, p. 1357-1368, mai. 1997.
- MCLAUGHLIN, F.; LA THANGUE, N.B. Histone deacetylase inhibitors open new doors in cancer therapy. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, n. 6, p. 1139-1144, set. 2004.
- MCLELLAN, E.A.; BIRD, R.P. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. **Cancer Res.**, v. 48, n. 21, p. 6187-6192, nov. 1988.
- MEDINA, V.; AFONSO, J.J.; ALVAREZ-ARGUELLES, H.; HERNANDEZ, C.; GONZALEZ, F. Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-

- dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. **JPEN: J. Parenter. Enteral Nutr.**, v. 22, n. 1, p. 14-17, jan.-fev. 1998.
- MOLL, U.M.; LAQUAGLIA, M.; BENARD, J.; RIOU, G. Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, n. 10, p. 4407-4411, mai 1995.
- MOLL, U.M.; RIOU, G.; LEVINE, A.J. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 89, n. 15, p. 7262-7266, ago. 1992.
- MOLL, U.M.; WOLFF, S.; SPEIDEL, D.; DEPERT, W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 17, n. 6, p. 631-636, dez. 2005.
- MORENO, F.S.; RIZZI, M.B.S.L.; DAGLI, M.L.Z.; PENTEADO, M.V.C. Inhibitory effects of beta-carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 10, p. 1817-1822, out. 1991.
- MORI, H.; SUGIE, S.; YOSHIMI, N.; HARA, A.; TANAKA, T. Control of cell proliferation in cancer prevention. **Mutat. Res.**, v. 428, n. 1-2, p. 291-298, jul. 1999.
- MUNSHI, A.; KURLAND, J.F.; NISHIKAWA, T.; TANAKA, T.; HOBBS, M.L.; TUCKER, S.L.; ISMAIL, S.; STEVENS, C.; MEYN, R.E. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 13, p. 4912-4922, jul. 2005.
- NAKANISHI C, TOI M. Nuclear factor-kappa B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 4, p. 297-309, abr. 2005.
- NAKANO, K.; MIZUNO, T.; SOWA, Y.; ORITA, T.; YOSHINO, T.; OKUYAMA, Y.; FUJITA, T.; FUJITA, N.O.; MATSUKAWA, Y.; TOKINO, T.; YAMAGISHI, H.; OKA, T.; NOMURA, H.; SAKAI, T. Butyrate activates the waf1/cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 35, p. 22199-22206, ago. 1997.
- NAKSHATRI, H.; BHAT-NAKSHATRI, P.; MARTIN, D.A.; GOULET, R.J.Jr; SLEDGE, G.W.Jr. Constitutive activation of NF-kappa B during progression of breast

cancer to hormone-independent growth. **Mol Cell Biol.**, v. 17, n. 7, p. 3629-3639, jul. 1997.

NEMETH, A.; NADASI, E.; GYONGYI, Z.; OLASZ, L.; NYARADY, Z.; EMBER, A.; KVARDA, A.; BUJDOSO, L.; ARANY, I.; KISS, I.; CSEJTEY, I.; EMBER, I. Early effects of different cytostatic protocols for head and neck cancer on oncogene activation in animal experiments. **Anticancer Res.**, v. 23, n. 6c, p. 4831-4835, nov-dez. 2003.

NEWTON, T.R.; PATEL, N.M.; BHAT-NAKSHATRI, P.; STAUSS, C.R.; GOULET, R.J.; NAKSHATRI, H. Negative regulation of transactivation function but not DNA binding of NF-kappa B and AP-1 by IkappaBbeta1 in breast cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n.26, p.18827-18835, jun. 1999.

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 J. Gastroenterol.**, v. 8, n. 5, p. 822-826, out. 2002.

NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; DIEGO, J.C.; GO'MEZ, L.A.; HIGES, M. HPLC Determination of low molecular weight organic acids in honey with series-coupled ion-exclusion columns. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 26, n. 8, p. 1231-1253, 2003.

OGAWA, K.; MEDLINE, A.; FARBER, E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: a comparative study of the ultrastructure of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. **Lab. Invest.**, v. 41, n. 1, p. 22-35, jul. 1979.

OGAWA, K.; YASUMURA, S.; ATARASHI, Y.; MINEMURA, M.; MIYAZAKI, T.; IWAMOTO, M.; HIGUCHI, K.; WATANABE, A. Sodium butyrate enhances Fas-mediated apoptosis of human hepatoma cells. **J. Hepatol.**, v. 40, n. 2, p. 278-284, fev. 2004.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, ago. 2004.

OLIVEIRA, V.N.; MAZZANTINI, R.P.; ONG, T.P.; JORDÃO Jr., A.A.; VANNUCCHI, H.; DAGLI, M.L.Z.; MORENO, F.S. Absence of inhibitory effects of phenylacetate on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. **Int. J. Med. Environ.**, v. 29, p. 179-184, 2001.

- ONG, T.P.; HEIDOR, R.; DE CONTI, A.; DAGLI, M.L.Z.; 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, jun. 2006.
- ORCHEL, A.; DZIERZEWICZ, Z.; PARFINIEWICZ, B.; WEGLARZ, L.; WILCZOK, T. Butyrate-induced differentiation of colon cancer cells is PKC and JNK dependent. **Dig. Dis. Sci.**, v. 50, n. 3, p. 490–498, mar. 2005.
- ÖZDAĞ, H.; TESCHENDORFF AE, AHMED AA, HYLAND SJ, BLENKIRON C, BOBROW L, VEERAKUMARASIVAM A, BURTT G, SUBKHANKULOVA T, ARENDS MJ, COLLINS VP, BOWTELL D, KOUZARIDES T, BRENTON JD, CALDAS C. Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. **BMC Genomics**, v. 7, abr. 2006.
- PARODI, P.W. Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. **J. Nutr.**, v. 127, n. 6, p. 1055–1060, jun. 1997.
- PERERA, F.P. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 88, n. 8, p. 496-509, abr. 1996.
- PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v. 5, n. 9, p. 2280–2286, jun. 1991.
- PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P.; TEEGUARDEN, J.; HSIA, S.; CAMPBELL, H. Quantification of multistage carcinogenesis in rat liver. **Toxicol. Pathol.**, v. 24, n. 1, p. 119–128, jan.-fev. 1996.
- PITOT, H.C. Pathway of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 859-860, set. 2001.
- PLACE, R.F.; NOONAN, E.J.; GIARDINA, C. HDAC inhibition prevents NF- κ B activation by suppressing proteasome activity: Down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I κ B α . **Biochem. Pharmacol.**, v. 70, n. 3, p. 394–406, ago. 2005.
- POIRIER, M.C. Chemical-induced DNA-damage and human cancer risk. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 8, p. 630-637, Ago. 2004.

- PRIVES, C.; HALL, P.A. The p53 pathway. **J. Pathol.**, v. 187, n. 1, p. 112–126, jan. 1999.
- QUIVY, V.; VAN LINT, C. Regulation at multiple levels of NF-kappa B-mediated transactivation by protein acetylation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, n. 6, p. 1221-1229, set. 2004.
- RICHARD, D.; HOLLENDER, P.; CHENAIS, B. Butyric acid increases invasiveness of HL-60 leukemia cells: role of reactive oxygen species. **FEBS Lett.**, v. 518, n. 1-3, p. 159-163, mai. 2002.
- RIZZI, M.B.S.L.; DAGLI, M.L.Z.; JORDÃO Jr., A.A.; PENTEADO, M.V.C.; MORENO, F.S. β -Carotene inhibits persistent and stimulates remodeling γ GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 67, n. 6, p. 415-422, 1997.
- ROOMI, M. W., KO, R. H., SARMA, D. S. R., FARBER, E. A common biochemical pattern in preneoplastic hepatocyte nodules generated in four different models in the rat. **Cancer Res.**, v. 45, n. 2, p. 564-571, fev. 1985.
- ROSIGNOLI, P.; FABIANI, R.; DE BARTOLOMEO, A.; SPINOZZI, F.; AGEA, E.; PELLI, M.A.; MOROZZI, G. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 10, p. 1675-1680, out. 2001.
- RUEMMELE, F.M.; SCHWARTZ, S.; SEIDMAN, E.G.; DIONNE, S.; LEVY, E.; LENTZE, M.J. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 94-100, jan. 2003.
- RUST, C.; GORES, J. G. Apoptosis and liver disease. **Am. J. Med.**, v. 108, n. 7, p. 567-574, mai. 2000.
- SACCANI, S.; PANTANO, S.; NATOLI, G. Two waves of nuclear factor kappa B recruitment to target promoters. **J. Exp. Med.**, v. 193, n. 12, p. 1351–1359, jun. 2001.
- SAITO, H.; EBINUMA, H.; TAKAHASHI, M.; KANEKO, F.; WAKABAYASHI, K.; NAKAMURA, M.; ISHII, H. Loss of butyrate-induced apoptosis in human hepatoma cell lines HCC-M and HCC-T having substantial bcl-2 expression. **Hepatology**, v. 27, n. 5, p. 1233-1240, mai. 1998.

- SANTOS-ROSA, H.; CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 41, n. 16, p. 2381-2402, nov. 2005.
- SCHEPPACH, W.; BARTRAM, P.; RICHTER, A.; RICHTER, F.; LIEPOLD, H.; DUSEL, G.; HOFSTETTER, G.; RUTHLEIN, J.; KASPER, H. Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. **JPEN: J. Parenter. Enteral Nutr.**, v. 16, n. 1, p. 43-48, jan.-fev. 1992.
- SCHRÖDER, C.; MAURER, H.R. Tributyrin-induced differentiation promotes apoptosis of LS 174T colon cancer cells in vitro. **Int. J. Oncol.**, v. 20, n. 1, p. 195-200, jan. 2002.
- SCHULTE-HERMANN, R.; BURSCH, W.; GRASL-KRAUPP, B.; MARIAN, B.; TOROK, L.; KAHL-RAINER, P.; ELLINGER, A. Concepts of cell death and application to carcinogenesis. **Toxicol. Pathol.**, v. 25, n. 1, p. 89-93, jan-fev. 1997.
- SCHULTE-HERMANN, R., HUFNAGL, K., LOW-BASELLI, A., ROSSMANITH, W., WAGNER, A., RUTTKAY-NEDECKY, B., BURSCH, W., MULLAUER, L., PARZEFALL, W., GRASL-KRAUPP, B. Apoptosis and hepatocarcinogenesis. **Digestion**, v. 59, n. 2, p. 64-65, jul. 1998.
- SCHULTE-HERMANN, R.; TIMMERMAN-TROSIENER, I.; BARTHEL, G.; BURSCH, W. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. **Cancer Res.**, v. 50, n. 16, p. 5127-5135, ago. 1990.
- SEMPLE-ROBERTS, E.; HAYES, M.A.; ARMSTRONG, D.; BECKER, R.A.; RACZ, W.J.; FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **Int. J. Cancer**, v. 40, n. 5, p. 643-645, nov. 1987.
- SENGUPTA, S.; VONESCH, J.L.; WALTZINGER, C.; ZHENG, H.; WASYLYK, B. Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. **EMBO J.**, v. 19, n. 22, p. 6051-6064, nov. 2000.
- SHER, G.D.; GINDER, G.D.; LITTLE, J.; YANG, S.; DOVER, G.J., OLIVIERI, N.F. Extended therapy with intravenous arginine butyrate in patients with beta-hemoglobinopathies. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 24, p. 1606-1610, jun. 1995.

- SHERR, C.J.; McCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, n. 2, p. 103-112, ago. 2002.
- SILVEIRA, E.R.; NAVES, M.M.V.; VANNUCCHI, H.; JORDÃO Jr., A.A.; DAGLI, M.L.Z.; MORENO, F.S. Vitamin A and all-trans and 9-cis retinoic acids inhibit cell proliferation during the progression phase of hepatocarcinogenesis in Wistar rats. **Nutr. Cancer**, v. 39, n. 2, p. 244-251, 2001.
- SIMILE, M.M.; PAGNAN, G.; PASTORINO, F.; BRIGNOLE, C.; DE MIGLIO, M.R.; MURONI, M.R.; ASARA, G.; FRAU, M.; SEDDAIU, M.A.; CALVISI, D.F.; FEO, F.; PONZONI, M.; PASCALE, R.M. Chemopreventive N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (fenretinide) targets deregulated NF- κ B and Mat1A genes in the early stages of rat liver carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 2, p. 417-427, fev. 2005.
- SINGH, B.; HALESTRAP, A.P.; PARASKEVA, C. Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 6, p. 1265-1270, jun. 1997.
- SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, n. 1, p. 184-191, mar. 1988.
- SOLT, D.T.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p. 701-703, out. 1976.
- SOUSSI, T.; LOZANO, G. p53 mutation heterogeneity in cancer. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 331, n. 3, p. 834-842, jun. 2005.
- 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, n. 6, p. 1332-1338, mai. 1976.
- SPORN, M.B.; LIBY, K.T. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nat. Clin. Pract. Oncol.**, v. 2, n. 10, p.518-525, out. 2005.
- SPORN, M.B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 7, p. 537-743, jul. 2002.

- SQUIRE, R. A.; LEVITT, M. H. Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. **Cancer Res.**, v. 35, n. 11, p. 3214-3223, nov. 1975.
- STEELE, V.E.; MOON, R.C.; LUBET, R.A.; GRUBBS, C.J.; REDDY, B.S.; WARGOVICH, M.; MCCORMICK, D.L.; PEREIRA, M.A.; CROWELL, J.A.; BAGHERI, D.; SIGMAN, C.C.; BOONE, C.W.; KELLOFF, G.J. Preclinical efficacy evaluation of potential chemopreventive agents in animal carcinogenesis models: methods and results from the NCI chemoprevention testing program. **J. Cell. Biochem. Suppl.**, v. 20, p. 32-54, 1994.
- STEELE, V.E.; SHARMA, S.; MEHTA, R.; ELMORE, E.; REDPATH, L.; RUDD, C.; CARTER, C.; BAGHERI, D.; SIGMAN, C.C.; KELLOFF, G.J. Use of in vitro assays to predict the efficacy of chemopreventive agents in whole animals. **J. Cell. Biochem. Suppl.**, v. 26, p. 29-53, 1996.
- STINCHCOMBE, S.; BUCHMANN, A.; BOCK, K.W.; SCHWARZ, M. Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 6, p. 1271-1275, jun. 1995.
- STONER, G.D.; MORSE, M.A.; KELLOFF, G.J. Perspectives in cancer chemoprevention. **Environ. Health. Perspect.**, v. 105, n. 4, p. 945-954, jun. 1997.
- STRUHL, K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. **Genes Dev.**, v. 12, n. 5, p. 599-606, mar. 1998.
- SU, Q.; BANNASCH, P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. **Toxicol. Pathol.**, v. 31, n. 1, p. 126-133, jan.-fev. 2003.
- SU, Q.; BENNER, A.; HOFMANN, W.J.; OTTO, G.; PICHLMAYR, R.; BANNASCH, P. Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. **Virchows Arch.**, v. 431, n. 6, p. 391-406, dez. 1997.
- SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768-780, out. 2003.
- 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, n. 9, p. 1447-1454, set. 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, n. 11, p. 5049-5058, nov. 1983.
- TERUI, T.; MURAKAMI, K.; TAKIMOTO, R.; TAKAHASHI, M.; TAKADA, K.; MURAKAMI, T.; MINAMI, S.; MATSUNAGA, T.; TAKAYAMA, T.; KATO, J.; NIITSU, Y. Induction of PIG3 and NOXA through acetylation of p53 at 320 and 373 lysine residues as a mechanism for apoptotic cell death by histone deacetylase inhibitors. **Cancer Res.**, v. 63, n. 24, p. 8948–8954, dez. 2003.
- TESSEMA, M.; LEHMANN, U.; KREIPE, H. Cell cycle and no end. **Virchows Arch.**, v. 444, n. 4, p. 313–323, abr. 2004.
- THORGEIRSSON, S.S.; GRISHAM, J.W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Nat. Genet.**, v. 31, v. 4, p. 339-346, ago. 2002.
- TOLEDO, L.P.; ONG, T.P.; PINHO, A.L.; JORDAO, A.Jr.; VANUCCHI, H.; MORENO, F.S. Inhibitory effects of lutein and lycopene on placental glutathione S-transferase-positive preneoplastic lesions and DNA strand breakage induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis. **Nutr. Cancer**, v. 47, n. 1, p. 62-69, 2003.
- TOMATIS, L. Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on an IARC workshop report. International Agency for Research on Cancer. **Environ. Health. Perspect.**, v. 101, n. 5, p. 149-151, dez. 1993.
- TURNER, B.M. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 12, n. 2, p. 110-112, fev. 2005.
- UNGERSTEDT, J.S.; SOWA, Y.; XU, W-S.; SHAO, Y.; DOKMANOVIC, M.; PEREZ, G.; NGO, L.; HOLMGREN, A.; JIANG, X.; MARKS, P.A. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, n. 3, p. 673-678, jan. 2005.
- VAN GIJSSEL, H.E.; OHLSON, L.C.E.; TORNDAL, U.B.; MULDER, G.J.; ERIKSSON, L.C.; PORSCHE-HÄLLSTRÖM, I.; MEERMAN, J.H.N. Loss of nuclear p53 protein in preneoplastic rat hepatocytes is accompanied by MDM2 and bcl-2 overexpression and by defective response to DNA damage in vivo. **Hepatology**, v. 32, n. 4, p. 701-710, out. 2000.

- VECCHIA, M.G.; FILHO, M.C.; FELLIPE, C.R.C.; CURI, R.; NEWSHOLME, E.A. Acetate and propionate potentiate the antiproliferative effect of butyrate on RBL-2H3 growth. **Gen. Pharmac.**, v. 29, n. 5, p. 725-728, nov. 1997.
- VENITT, S. Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer. **Clin. Chem.**, v. 40, n. 7, p. 1421-1425, jul. 1994.
- VERHOEVEN, D.T.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHN, R.A.; VAN DEN BRANDT, P.A.; VAN POPPEL, G. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. **Chem. Biol. Interact.**, v. 103, n. 2, p. 79-129, fev. 1997.
- VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v. 36, n. 3, p. 131-149, jun. 2003.
- VERNA, L., WHYSNER, J., WILLIAMS, G.M. 2-Acetylaminofluorene Mechanistic Data and Risk Assessment: DNA Reactivity, Enhanced Cell Proliferation and Tumor Initiation. **Pharmacol. Ther.**, v. 71, n. 1-2, p. 83-105, 1996 (b).
- VERNA, L., WHYSNER, J., WILLIAMS, G.M. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. **Pharmacol. Ther.**, v. 71, n. 1-2, p. 57-81, 1996 (a).
- VINEIS, P.; ALAVANJA, M.; BUFFLER, P.; FONTHAM, E.; FRANCESCHI, S.; GAO, Y.T.; GUPTA, P.C.; HACKSHAW, A.; MATOS, E.; SAMET, J.; SITAS, F.; SMITH, J.; STAYNER, L.; STRAIF, K.; THUN, M.J.; WICHMANN, H.E.; WU, A.H.; ZARIDZE, D.; PETO, R.; DOLL, R. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 96, n. 2, p. 99-106, jan. 2004.
- VISCONTI, R., CERUTTI, J., BATTISTA, S., FEDELE, M., TRAPASSO, F., ZEKI, K., MIANO, M. P., NIGRIS, F., CASALINO, L., CURCIO, F., SANTORO, M., FUSCO, A. Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NF- κ B p65 expression. **Oncogene**, v. 15, n. 16, p. 1987-1994, out. 1997.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Cancer genes and the pathways they control. **Nat. Med.**, v. 10, n. 8, p. 789-99, ago. 2004.
- VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307-310, nov. 2000.

- VOUSDEN, K.H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1602, n. 1, p. 47-59, mar. 2002.
- WARGOVICH, M.J.; CHEN, C.D.; JIMENEZ, A.; STEELE, V.E.; VELASCO, M.; STEPHENS, L.C.; PRICE, R.; GRAY, K.; KELLOFF, G.J. Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer: evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 5, n. 5, p. 355-360, mai. 1996.
- WATKINS, S.M.; CARTER, L.C.; MAK, J.; TSAU, J.; YAMAMOTO, S.; GERMAN, B. Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumor cells. **J. Dairy Res.**, v. 66, n. 4, p. 559-567, nov. 1999.
- WATTENBERG, L.W. An overview of chemoprevention: current status and future prospects. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 216, n. 2, p. 133-141, nov. 1997.
- WATTENBERG, L.W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res.**, v. 45, n. 1, p. 1-8, jan. 1985.
- WEBSTER, G.A.; PERKINS, N.D. Transcriptional Cross Talk between NF- κ B and p53. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 5, p. 3485-3495, mai. 1999.
- WESIERSKA-GADEK, J.; HORKY, M. How the nucleolar sequestration of p53 protein or its interplayers contributes to its (re)-activation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1010, p. 266-272, dez. 2003.
- WILLIAMS, E.A.; COXHEAD, J.M.; MATHERS, J.C. Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 62, n. 1, p. 107-115, fev. 2003.
- WILLIAMS, G. M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. **Toxicology**, v. 166, n. 1-2, p. 3-10, set. 2001.
- WILLIAMS, G.M. The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 605, n. 2, p. 167-189, mai. 1980.
- WINTERSBERGER, E.; MUDRAK, I.; WINTERSBERGER, U. Butyrate inhibits mouse fibroblasts at a control point in the G1 phase. **J. Cell. Biochemistry**, v. 21, n. 3, p. 239-247, 1983.

- WITT, O.; SCHULZE, S.; KANBACH, K.; ROTH, C.; PEKRUN, A. Tumor cell differentiation by butyrate and environmental stress. **Cancer Lett.**, v. 171, n. 2, p. 173-182, out. 2001.
- WONG, C.S.; SENGUPTA, S.; TJANDRA, J.J.; GIBSON, P.R. The influence of specific luminal factors on the colonic epithelium: high-dose butyrate and physical changes suppress early carcinogenic events in rats. **Dis Colon Rectum**, v. 48, n. 3, p. 549-559, mar. 2005.
- WOOD, G.A.; KORKOLA, J.E.; ARCHER, M.C. Tissue-specific resistance to cancer development in the rat: phenotypes of tumor-modifier genes. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 1, p. 1-9, jan. 2002.
- WOOD, G.A.; SARMA, D.S.; ARCHER, M.C. Resistance to the promotion of glutathione S-transferase 7-7-positive liver lesions in Copenhagen rats. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 7, p. 1169-75, jul. 1999.
- WORLD CANCER RESEARCH FOUNDATION/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Patterns of cancer**. In: Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC, 1997. 17p.
- YAMAMOTO, H.; FUJIMOTO, J.; OKAMOTO, E.; FURUYAMA, J.; TAMAOKI, T.; HASHIMOTO, T. Suppression of growth of hepatocellular carcinoma by sodium butyrate in vitro and in vivo. **Int. J. Cancer**, v. 76, n. 6, p. 897-902, jun. 1998.
- YANAGI, S.; YAMASHITA, M.; IMAI, S. Sodium butyrate inhibits the enhancing effect of high fat diet on mammary tumorigenesis. **Oncology**, v. 50, n. 4, p. 201-204, jul.-ago. 1993.
- YAN, J.; XU, Y.H. Tributyrin inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest. **World J. Gastroenterol.**, v. 9, n. 4, p. 660-664, abr. 2003.
- YIN, L.; LAEVSKY, G.; GIARDINA, C. Butyrate suppression of colonocyte NF- κ B activation and cellular proteasome activity. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 48, p. 44641-44646, nov. 2001.
- YOUNG, M.R.; YANG, H-S.; COLBURN, N.H. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF- κ B and Pcd4. **Trends Mol. Med.**, v. 9, n. 1, p. 36-41, jan. 2003.

- YU, J.; ZHANG, L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 331, n. 3, p. 851-8, jun. 2005.
- ZENG, H.; BRISKE-ANDERSON, M. Prolonged butyrate treatment inhibits the migration and invasion potential of HT1080 tumor cells. **J. Nutr.**, v. 135, n. 2, p. 291–295, fev. 2005.
- ZERBAN, H.; RADIG, S.; KOPP-SCHNEIDER, A.; BANNASCH, P. Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 11, p. 2467-2473, nov. 1994.
- ZHANG, J.; WU, G.; CHAPKIN, R.S.; LUPTON, J.R. Energy metabolism of rat colonocytes changes during the tumorigenic process and is dependent on diet and carcinogen. **J. Nutr.**, v. 128, n. 8, p. 1262–1269, ago. 1998.
- ZHONG, H.; MAY, M.J.; JIMI, E.; GHOSH, S. The phosphorylation status of Nuclear NF- κ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. **Mol. Cell**, v. 9, n. 3, p. 625–636, mar. 2002.
- ZONG, W.X.; THOMPSON, C.B. Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev.**, v. 20, n. 1, p. 1-15, jan. 2006.