UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Efeito Quimiopreventivo da β -ionona nas Fases de Iniciação e Seleção/Promoção da
Hepatocarcinogênese Associada ao Desenvolvimento de Esteatose Hepática Não
Alcoólica em Ratos Wistar

Aline Henriques Guariento

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Efeito Quimiopreventivo da β -ionona nas Fases de Iniciação e Seleção/Promoção da
Hepatocarcinogênese Associada ao Desenvolvimento de Esteatose Hepática Não
Alcoólica em Ratos Wistar

Aline Henriques Guariento

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo
2017

Aline Henriques Guariento

Efeito Quimiopreventivo da β -ionona nas Fases de Iniciação e Seleção/Promoção da
Hepatocarcinogênese Associada ao Desenvolvimento de Esteatose Hepática Não
Alcoólica em Ratos Wistar

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, 02 de Agosto de 2017

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

G915e Guariento, Aline Henriques
 Efeito quimiopreventivo da Beta-ionona nas fases
de iniciação e seleção/promoção da hepatocarcinogênese
associada ao desenvolvimento de esteatose hepática
não-alcoólica em ratos Wistar / Aline Henriques
Guariento. - São Paulo, 2017.
 68 p.

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

1. Quimioprevenção. 2. Hepatocarcinogênese. 3.
Beta-ionona. 4. NAFLD. 5. Obesidade. I. T. II.
Moreno, Fernando Salvador, orientador.

**“Sei que o meu trabalho
É uma gota no oceano
Mas sem ele,
O oceano seria menor.”**

(Madre Teresa de Calcutá)

Ao meu marido David e a minha filha Isabela com todo amor.

A vocês, dedico.

Agradecimentos

Primeiramente, aquele que me deu a vida, Deus, o qual me acompanhou durante toda a jornada, me dando força e saúde para enfrentar todas as dificuldades. Agradeço por iluminar o meu caminho a cada dia.

Um agradecimento especial ao Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno, excelente docente e verdadeiro amante da pesquisa. Professor que me ensinou que em pesquisa mais choramos do que rimos, e isso torna cada vez mais viciante essa arte da busca pelas respostas de tantas e tantas perguntas. Foi com ele que aprendi que antes de qualquer coisa é necessário estudar, e estudar muito. Agradeço por todos os ensinamentos e pelo estímulo e exigência crescente que me fizeram descobrir e me apaixonar pelo maravilhoso mundo da pesquisa. Agradeço pela paciência e por não ter desistido de mim. Eu tenho muito orgulho de ter sido sua aluna.

À minha mãe que batalhou muito para me fornecer a oportunidade de alcançar meus sonhos. Sem ela nada disso se tornaria uma realidade. Exemplo de perseverança, responsabilidade e coragem.

Ao meu pai, que mesmo distante, pode me apoiar nas horas difíceis.

Ao meu marido, David, por todo apoio, carinho, atenção, dedicação e paciência durante mais essa longa jornada. Agradeço por me fazer mais feliz a cada dia e por ter me dado o meu maior tesouro, nossa filha.

Agradeço a minha filha Isabela, minha pulguinha, que me ensinou o verdadeiro sentido da palavra amor. O amor não nasce na boca, vem de dentro do coração, requer dedicação, abdicção, doação, mas ganhamos muito mais do que oferecemos. Filha, sem você a vida não tem mais sentido, tudo vale a pena por você.

Ao meu avô Dirceu, que infelizmente Deus quis levá-lo para pertinho dEle quando eu estava no meio do doutorado. Agradeço por toda a base que você me deu; ela é essencial na minha vida. Dedico essa tese a você também, você confiou em mim e tinha certeza que eu conseguiria chegar até aqui. Você faz uma falta imensa, a vida fica menos colorida com você longe.

Agradeço à minha irmã Andressa pelo apoio, você é a gorda mais importante pra mim.

À minha avó Vilma por fazer parte da minha base. Meu exemplo de mulher forte, guerreira, amante da vida.

Agradeço ao sogro e a sogra, Fiore e a Lana, pelo exemplo. Os admiro muito e é muito bom saber que em vocês sempre encontrarei um porto seguro, mesmo não sendo filha. Obrigada pelos conselhos, pela amizade, pelos momentos de alegria, risadas, descontração e por todo o apoio e coragem que me deram durante essa etapa. Obrigada por toda a ajuda com a Isabela, por deixarem

de viver a vida de vocês durante mais de 1 ano para cuidar da minha filha praticamente período integral. Sem a ajuda de vocês não teria conseguido chegar ao final desse trabalho. Obrigada por existirem, vocês tornam a minha vida mais leve e feliz.

À Juvencar por me proporcionar tantas reflexões sobre religião, caráter, amizade, e permitir que eu cresça a cada dia. Vocês são essenciais. Obrigada por me mostrar como é bom ser católico.

Agradeço ao Prof. Dr. Thomas Prates Ong, quem considero um grande e admirável pesquisador, pela sua vocação acadêmica. Agradeço por todo o apoio e por todos os ensinamentos e filosofias.

À Profa. Ana Beatriz Ramos de Oliveira Pinn pela confiança e por ter me aberto as portas para o mundo da pesquisa.

Agradeço à Kelly Silva Furtado por todo o apoio durante esses quatro anos. Agradeço por toda a dedicação, por todas as críticas construtivas.

Agradeço a todos do laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer por todo auxílio na condução deste trabalho e pelos momentos de descontração essenciais ao bom andamento dessa tese. Agradeço em especial ao Ernesto Mendes Vargas pela ajuda na difícil tarefa das análises estatísticas.

Ao Prof. Luis Fernando Barbisan, da UNESP Campus Botucatu, ao Prof Bruno Cogliati, da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, bem como ao Prof Eduardo Purgatto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela colaboração a este trabalho.

Aos demais professores e colegas do departamento, que sempre me ajudaram e me deram suporte ao longo desta jornada. À funcionária Lurdinha, por tentar manter a ordem no laboratório e pelos deliciosos cafés.

Ainda aos excelentes profissionais Cléo, Edilson, Mônica e Roberta, do B14, que jamais exitaram em ajudar e aos funcionários da seção de pós, pela paciência e bom-humor que sempre me atenderam.

Aos funcionários do biotério, pelos cuidados despendidos com os animais e pelo suporte que me foi dado nesta etapa tão importante.

À agência de fomento, CNPq, pela concessão da minha bolsa e a FAPESP pelo suporte financeiro ao laboratório, sem os quais não seria possível completar essa jornada.

Resumo

GUARIENTO, A.H. **Efeito Quimiopreventivo da β -ionona nas Fases de Iniciação e Seleção/Promoção da Hepatocarcinogênese Associada ao Desenvolvimento de Esteatose Hepática Não Alcoólica em Ratos Wistar.** 2017. f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Dentre as neoplasias primárias que acometem o fígado, o carcinoma hepatocelular (HCC) é a mais frequente. Diversos fatores de risco predisõem ao HCC, entre eles a doença hepática gordurosa não-alcoólica (NAFLD). Segundo estudos prévios do grupo, a β -ionona (BI), presente em uvas e aromatizantes de vinho, apresenta potencial quimiopreventivo da hepatocarcinogênese. Além disso, a β I parece atuar na redução da colesterolemia podendo, assim, influenciar a NAFLD. Desta forma pretendeu-se, neste projeto, avaliar o desenvolvimento da NAFLD e sua influência nas etapas de iniciação e seleção/promoção da hepatocarcinogênese em ratos *Wistar* submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH), além da atividade quimiopreventiva da β I, nessas condições experimentais em ratos. Para isso, os animais foram alocados em 6 grupos experimentais: RH iniciação (n=11), NAFLD iniciação (n=15), BI iniciação (n=15), RH seleção/promoção (n=11), NAFLD seleção promoção (n=15) e BI seleção/promoção (n=15). Na fase de iniciação os animais do grupo NAFLD receberam, diariamente, emulsão hipercalórica até a sexta semana do experimento um dia antes da administração de DEN. Já na fase de seleção/promoção os animais do grupo NAFLD receberam a emulsão hipercalórica, a partir de um dia após a DEN. Os animais dos grupos RH da iniciação e da seleção/promoção servem como controles e receberam, diariamente, 1mL/100g peso corpóreo de água até a sexta semana do experimento e um dia após a DEN, respectivamente. Na fase de iniciação, após 13 semanas os animais do grupo NAFLD não demonstraram sinais de esteatose, apresentaram maiores níveis séricos de triacilglicerol, colesterol total e LDL comparados ao grupo RH ($P<0,05$). O grupo NAFLD apresentou maior porcentagem de nódulos macroscópicos, bem como maior número e porcentagem de área hepática de lesões pré neoplásicas persistentes (pLPN) comparado ao grupo RH ($P<0,05$). Já o grupo BI apresentou menor número de pLPN e maior número de lesões em remodelação e uma maior porcentagem de área hepática de rLPN ($p<0,05$). Em relação a proliferação celular, o grupo NAFLD apresentou maior número de células em surrounding, pLPN e rLPN comparada ao grupo RH e o grupo BI menor número em pLPN comparada a NAFLD. Já na fase de seleção/promoção foi possível observar o grupo NAFLD tem maiores valores de focos de inflamação, hepatócitos balonizados e grau de esteatose hepática em relação ao grupo BI, assim como maiores níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total e LDL ($p<0,05$). O grupo NAFLD apresentou maior porcentagem de nódulos macroscópicos <1 , maior número, menor tamanho médio de pLPN comparados ao grupo RH ($p<0,05$). O grupo BI apresentou menor número e menor porcentagem de área em pLPN e maior porcentagem de área em rLPN ($p<0,05$). Em relação a proliferação celular, o grupo NAFLD apresentou maior número de células em surrounding, pLPN e rLPN comparada ao grupo RH ($p<0,05$). Na expressão gênica, o grupo BI apresentou maior expressão de HMGCR em relação grupo NAFLD ($p<0,05$), O grupo NAFLD apresentou maior expressão de INSIG1 em relação ao grupo RH ($p<0,05$) e tendência na expressão de INSIG 2.

Palavras-chaves: Quimioprevenção. Hepatocarcinogênese. Beta-Ionona. NAFLD. Obesidade

Abstract

Guariento, A.H. **Chemopreventive Effect of β -ionone in the Phases of Initiation and Selection/Promotion of Hepatocarcinogenesis Associated with the Development of Non-Alcoholic Steatosis in Wistar Rats**. 2017. f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Cancer is a major public health problems in the world. Among the primary neoplasm affecting the liver, hepatocellular carcinoma (HCC) is the most frequent. Several risk factors predispose to HCC, including the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). According to previous studies of the group, β -ionone (BI), present in grapes and flavors of wine, it presents potential chemopreventive of hepatocarcinogenesis. Furthermore, β I appears to act in reducing blood cholesterol and may thus influence NAFLD. In this way it was intended in this project, evaluate the development of NAFLD and its influence on the steps of initiation and selection/promotion of hepatocarcinogenesis in Wistar rats resistant hepatocyte model (HR), and the chemopreventive activity of β I, these experimental conditions in rats. For this, the animals were divided into 6 groups: RH initiation (n = 11), NAFLD initiation (n = 15), BI initiation (n = 15), HR selection / promotion (n = 11), NAFLD selection promotion (n = 15) and BI selection / promotion (n = 15). In the inception phase of the NAFLD group animals received daily calorie emulsion until the sixth week of the experiment one day prior to DEN administration. In the selection / promotion stage NAFLD group of animals received hypercaloric emulsion, from one day after the DEN. The animals of groups HR and selection of initiation / promotion serve as controls and received daily 1mL / 100g body weight of water until the sixth week of the experiment, and one day after DEN respectively. In the initiation phase, after 13 weeks the animals of group NAFLD showed no signs steatosis, had higher serum levels of triglyceride, total cholesterol and LDL compared to the HR group (P <0.05). The NAFLD showed higher prevalence of macroscopic nodules as well as higher number and percentage of liver area of persistent pre-neoplastic lesions (pLPN) compared to the HR group (P <0.05). But the BI group had fewer pLPN and higher number of lesions in remodeling and a higher percentage of liver area rLPN (p <0.05). In relation to cell proliferation, the NAFLD group had a higher number of cells in surrounding, pLPN and rLPN compared to the RH group and the lowest number in pLPN BI group compared to NAFLD. In the selection / promotion layer was observed NAFLD group has the highest values of inflammation foci, balonizados hepatocytes and hepatic steatosis grade in relation to BI group as well as higher serum levels of triglyceride, total cholesterol and LDL (p <0, 05). The NAFLD showed higher prevalence of macroscopic nodules <1, more, smaller average size pLPN compared to the HR group (p <0.05). The BI group had fewer and smaller percentage area in pLPN and higher percentage of area rLPN (p <0.05). In relation to cell proliferation, the NAFLD group had a higher number of cells in surrounding, pLPN and rLPN compared to the HR group (p <0.05). In gene expression, the BI group showed higher expression of HMGCR regarding NAFLD group (p <0.05), the NAFLD group had higher expression of INSIG1 against the RH group (p <0.05) and a tendency in the expression of INSIG 2.

Keywords: Chemoprevention. Hepacarcinogenesis. Beta-ionone. NAFLD. Obesity.

Sumário

1. Introdução.....	17
1.1 Epidemiologia.....	17
1.2 Hepatocarcinogênese.....	17
1.3 Associação entre NAFLD e HCC.....	19
1.4 Quimioprevenção e β -ionona.....	21
2. Objetivos.....	24
3. Material e Métodos.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Emulsão Hipercalórica.....	25
3.3 Modelo do “Hepatócito Resistente”	26
3.4 Protocolo Experimental.....	27
3.5 Eutanásia dos Animais e Coleta das Amostras.....	28
3.6 Determinação da Presença e do Grau de NAFLD.....	28
3.7 Exame Macroscópico dos Fígados.....	29
3.8 Marcação imunoistoquímica para GST-P e PCNA.....	29
3.8.1 Procedimento para Identificação e Quantificação de LPN GST-P Positivas.....	29
3.8.2 Quantificação da Proliferação Celular.....	30
3.9 Quantificação de Corpúsculos Apoptóticos.....	30
3.10 Quantificação de Células Marcadas por Oil-Red.....	30
3.11 Quantificação de Beta-ionona no fígado.....	30
3.12 Quantificação de Colesterol Total, HDL, LDL, AST, ALT e Triglicerídeos.....	31
3.13 Avaliação da Expressão Gênica de <i>Thy-1</i> , <i>Insig 1</i> , <i>Insig 2</i> e <i>Hmgcr</i> por RT- qPCR.....	31
3.11 Análise Estatística dos Dados.....	32
4. Resultados.....	33
4.1 Evolução do Peso Corpóreo e do Consumo de Ração.....	33
4.1.1 Iniciação.....	33
4.1.2 Seleção/Promoção.....	34
4.2 Peso Hepático Relativo dos Animais.....	36

4.3	Análise Histológica do Fígado dos Animais.....	36
4.4	Níveis Séricos de Triglicerídeos, Colesterol Total, c-HDL, c-LDL dos Animais.....	37
4.5	Macroscopia dos Animais.....	39
4.6	Morfometria dos Animais.....	40
4.6.1	Número de Lesões Pré Neoplásicas.....	40
4.6.2	Área Média de Lesões Pré Neoclássicas.....	42
4.6.3	Porcentagem de Área Ocupada por Lesões Pré Neoplásicas.....	43
4.7	Proliferação Celular em Cortes Histológicos de Fígado dos Animais.....	45
4.8	Apoptose.....	46
4.8.1	Iniciação.....	46
4.8.2	Seleção/Promoção.....	47
4.9	Quantificação de gordura hepática.....	48
4.9.1	Iniciação.....	48
4.9.2	Seleção/Promoção.....	49
4.10	Quantificação de Beta-ionona.....	49
4.10.1	Iniciação.....	49
4.10.2	Seleção/Promoção.....	50
4.11	Escore de Células Ovais.....	51
4.12	Expressão Gênica de <i>Thy1</i> , <i>Insig 1</i> , <i>Insig 2</i> , e <i>Hmgcr</i> dos Animais.....	52
5.	Discussão.....	54
6.	Conclusão.....	58
7.	Referências Bibliográficas.....	59
Anexo I.		64
Anexo II.		65
Anexo III.		66
Anexo IV.		67

Lista de Figuras

Figura 1: Protocolo experimental do experimento de iniciação (A) e do experimento de seleção/promoção (B).....	28
Figura 2: Evolução do peso de ratos Wistar dos grupos RH, NAFLD e BI durante a fase de iniciação do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”. Cada ponto representa a média da massa corporal do grupo correspondente nesse ponto de tempo. RH (n=6), NAFLD (n = 6) e BI (n=8).....	33
Figura 3: Consumo de ração de ratos Wistar dos grupos RH, NAFLD e BI durante a fase de iniciação do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”. Cada ponto representa a média da massa corporal do grupo correspondente nesse ponto de tempo. RH (n = 6), NAFLD (n = 6) e BI (n = 8).....	34
Figura 4: Evolução do peso de ratos Wistar dos grupos RH, NAFLD e BI durante a fase de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”. Cada ponto representa a média da massa corporal do grupo correspondente nesse ponto de tempo. RH (n = 6), NAFLD (n = 7) e BI (n = 5).....	35
Figura 5: Consumo de ração de ratos Wistar dos grupos RH, NAFLD e BI durante a fase de promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”. Cada ponto representa a média da massa corporal do grupo correspondente nesse ponto de tempo. RH (n = 6), NAFLD (n =7) e BI (n=5).....	35
Figura 6: Peso hepático relativo dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Iniciação: RH (n = 6), NAFLD (n = 6) e BI (n = 8); Seleção/promoção: RH (n = 6), NAFLD (n =7) e BI (n=5).....	36
Figura 7: Escore de Kleiner dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Seleção/promoção: RH (n = 6), NAFLD (n = 7) e BI (n = 5).....	37
Figura 8: Níveis sérios de ALT, AST, fosfatase alcalina, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol HDL e colesterol LDL dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Iniciação: RH (n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5); Seleção/Promoção: RH (n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5).....	38

Figura 9: Número de lesões pré neoplásicas totais, persistentes e em remodelação dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Iniciação: RH (n = 6), NAFLD (n = 6) e BI (n = 8); Seleção/promoção: RH (n = 6), NAFLD (n = 7) e BI (n = 5).....41

Figura 10: Área média de lesões pré neoclássicas totais, persistentes e em remodelação dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Iniciação: RH (n = 6), NAFLD (n = 6) e BI (n = 8); Seleção/promoção: RH (n = 6), NAFLD (n = 7) e BI (n = 5).....42

Figura 11: Porcentagem da área ocupada por lesões pré neoclássicas totais, persistentes e em remodelação dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Iniciação: RH (n = 6), NAFLD (n = 6) e BI (n = 8); Seleção/promoção: RH (n = 6), NAFLD (n = 7) e BI (n = 5).....44

Figura 12: Proliferação celular em cortes histológicos de fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação da hepatocarcinogênese.....45

Figura 13: Proliferação celular em cortes histológicos de fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese.....46

Figura 14: Quantificação do índice apoptótico do fígado de animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH n=5), NAFLD (n=5) e BI (n=5) na fase de iniciação da hepatocarcinogênese. Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de NAFLD ($p<0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.....47

Figura 15: Quantificação do índice apoptótico do fígado de animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5) na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de NAFLD ($p<0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.....48

Figura 16: Quantificação da marcação do fígado de animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5) na fase de iniciação da hepatocarcinogênese. As barras representam a mediana de cada grupo de tratamento. As comparações foram feitas aos pares pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.....48

Figura 17: Quantificação da marcação do fígado de animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH n=5), NAFLD (n=5) e BI (n=5) na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. As barras representam a mediana de cada grupo de tratamento. As comparações foram feitas aos pares pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.....49

Figura 18: Concentração hepática de beta ionona (BI) de fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5) na fase de iniciação da hepatocarcinogênese. Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de NAFLD ($p<0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.....50

Figura 19: Concentração hepática de beta ionona (BI) de fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5) na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de NAFLD ($p<0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.....51

Figura 20: Escore de células ovais dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. As barras representam a mediana de cada grupo de tratamento. As comparações foram feitas aos pares pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Iniciação: RH (n = 6), NAFLD (n = 6) e BI (n = 8); Seleção/promoção: RH (n = 6), NAFLD (n = 7) e BI (n = 5).....51

Figura 15: Expressão gênica de *Hmgcr*, *Insig1*, *Insig2* e *Thy1* quantificada pela técnica de RT-qPCR dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Iniciação: RH (n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5); Seleção/Promoção: RH (n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5).....53

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores dos componentes da emulsão hipercalórica de referência para 1 mL.....26

Tabela 2: Incidência e multiplicidade dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH), NAFLD e BI na fase de iniciação da hepatocarcinogênese.....39

Tabela 3: Incidência e multiplicidade dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH), NAFLD e BI na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese.....40

1. Introdução

1.1 Epidemiologia

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo (SIEGEL et al, 2012). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) mais de 12,7 milhões de pessoas são diagnosticadas todo ano com neoplasias. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. Esse aumento será superior em países de perfis socioeconômicos reduzidos (INCA, 2014).

Das neoplasias que acometem o fígado, o carcinoma hepatocelular (HCC) é a mais frequente (INCA, 2016). Estima-se que por ano ocorram 748.300 novos casos e 695.900 mortes por HCC; este ocupa o sexto lugar dentre os cânceres de maior incidência (FREEDMAN, 2012) e o segundo dentre os de maior mortalidade (FITAMANT et al., 2016).

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

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

1.2 Hepatocarcinogênese

Hepatocarcinogênese é um complexo processo associado ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem durante as fases de iniciação, promoção e progressão (ZHENG et al, 2011). A transformação das células normais em malignas requer cerca da metade a 2/3 da vida dos animais (FARBER, 1990), ou de 20 a 40 anos, especialmente no caso de neoplasias sólidas em humanos (LOEB et al., 2003).

A primeira etapa da carcinogênese, conhecida como iniciação, envolve modificações genéticas irreversíveis e permanentes na célula afetada (PITOT, 2001; HANAHAN, D. &

WEINBERG, R. A, 2000, 2011). A etapa subsequente, chamada de promoção, é caracterizada pela expansão clonal das células iniciadas na presença contínua de um agente promotor, originando as lesões pré-neoplásicas (LPN) (LUCH, 2005). Este estágio é reversível, apresenta grande período de latência e representa o principal alvo da ação de agentes quimiopreventivos (PITOT, 2001; PITOT, 2007). A progressão da célula pré-maligna em maligna ocorre como consequência da divisão celular descontrolada, perda da estabilidade genética, aneuploidias, amplificações e deleções gênicas. Além disso, é irreversível (PITOT, 2007).

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

Assim, duas hipóteses têm sido propostas para explicar o potencial heterogêneo de células neoplásicas e o processo de desenvolvimento de neoplasias: o modelo estocástico, em que uma população distinta de células neoplásicas adquire um conjunto de mutações somáticas e desenvolve a capacidade metastática; e o modelo hierárquico, no qual neoplasias primárias e suas metástases são iniciadas por um número pequeno de células, conhecidas como células tronco neoplásicas ou “cancer stem cells” (CSC) (ODOUX et al, 2008). Este grupo celular pode atuar tanto no desenvolvimento quanto na progressão neoplásica, além disso, possui marcadores próprios, como *Thy 1*. Este marcador é reconhecido por atuar em diversos tipos de CSC, inclusive em células ovais reconhecidas como CSC do fígado em ratos (MEACHAM & MORRISON et al., 2013; SUKOWATI et al., 2013; XU et al., 2015).

Na presença de estímulos proliferativos, como uma hepatectomia parcial, por exemplo, um compartimento de células tronco/progenitoras que dá origem às células ovais é ativado. Estas células podem se diferenciar em hepatócitos ou células epiteliais dos ductos biliares (colangiócitos) bem como dar origem à neoplasia hepática (ROSKAMS, 2008; MISHRA et al., 2009; DARWICHE et al., 2011; OISHI; WANG, 2011). Este estado

proliferativo crônico poderia favorecer a transformação destas células imaturas, que interromperiam o processo de diferenciação em curso e se tornariam potencialmente neoplásicas (NAVES; MORENO, 2000; MARQUARDT; THORGEIRSSON, 2010).

Merece destaque que o padrão do desenvolvimento de neoplasias de fígado em ratos é semelhante ao que se observa em humanos (ANDERSEN et al., 2010). Foram observadas semelhanças morfológicas, bioquímicas e biológicas em LPN e neoplasias hepáticas em humanos e roedores. Isto indica que, independentemente dos fatores etiológicos, mecanismos básicos da hepatocarcinogênese em diferentes espécies podem ser similares (BANNASCH; HAERTEL; SU, 2003; FEO et al., 2008). Nesse sentido, modelos de hepatocarcinogênese vêm sendo considerados dentre os melhores para o estudo de LPN e neoplasias *in vivo*. Dentre eles, destaca-se o modelo do Hepatócito Resistente (RH) descrito em 1976 (SOLT; FARBER, 1976), modificado em 1987 (SEMPLE-ROBERTS et al., 1987) e adaptado para ratos Wistar em 1991 (MORENO et al., 1991).

Este modelo é adequado para induzir elevada incidência de LPN, bem como para se avaliar e comparar os efeitos de substâncias quimiopreventivas ou carcinogênicas capazes de modular o processo carcinogênico (SILVA-OLIVEIRA et al., 2010). O modelo do RH sincroniza as etapas da carcinogênese, o que permite avaliar suas etapas isoladamente. Cerca de 95-98% das LPN regredem e não evoluem para neoplasias, sofrendo “remodelação” (LPN em remodelação - rLPN), um processo altamente complexo que envolve mudanças no suprimento sanguíneo e em características bioquímicas, bem como da estrutura e arquitetura celulares, fazendo com que o fígado retorne ao aspecto “normal” anterior. As LPNs restantes (2-5%) seguem a persistência (LPN persistentes – pLPN), adquirem a capacidade de crescimento autônomo e progridem para adenomas e HCC (HIGASHI et al., 2004; FEO et al., 2008). Essas lesões podem ser identificadas pela marcação da enzima γ -glutamyltranspeptidase (GGT) (FEO et al., 2008) ou glutathione *S*-transferase forma placentária (GST-P) (HIGASHI et al., 2004; FEO et al., 2008).

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

1.3 Associação entre NAFLD e HCC

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

A NAFLD é um termo abrangente para um grupo de doenças definidas por esteatose hepática em mais de 5% dos hepatócitos na ausência de consumo de etanol (20 g de etanol para homens, correspondente a 2 latas de cerveja, 2 taças de vinho ou 2 doses de destilado; e 10 g para mulheres, correspondente a 1 lata de cerveja, 1 taça de vinho e 1 dose de destilado) (DURAZZO et al, 2012). A prevalência de NAFLD é estimada em 20% a 30% em indivíduos adultos ocidentais, com risco aumentado de 90 % na obesidade mórbida (DOWMAN et al, 2012).

A prevalência da obesidade apresenta proporções epidêmicas em todo o mundo. Dados de uma revisão realizada por UBONG et al (2017) sugerem que mais de um terço da população norte-americana é obesa e outro um terço tem sobrepeso. Segundo ALBERTI et al (2009), dois milhões de adultos estão com sobrepeso ou são obesos no mundo.

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

Considera-se que o modelo tradicional para desenvolvimento da NASH seja o de “2 impactos” proposto em 1998 por Day e James (DAY & JAMES, 1998). A primeira agressão caracteriza-se pelo desenvolvimento de esteatose em um contexto de obesidade e consequente resistência hepática e periférica à insulina. Esta etapa pode ser revertida e não leva necessariamente à injúria no fígado (HEBBARD & GEORGE, 2011; TAKAHASHI et al, 2012).

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

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

A transição da esteatose para NASH representa um importante passo na patogênese desta afecção, que pode progredir para cirrose e falência hepática, estando associada ao

aumento do risco de desenvolvimento de HCC (BIEGHS et al, 2012; GUERRERIO et al, 2012).

Existe uma variedade de modelos experimentais com animais que utiliza alterações genéticas e de padrões de alimentação para o estudo de NAFLD (LARTER & YEH, 2008). A maioria dos modelos experimentais alimentares foca-se em prover um consumo que aumente o dano hepático (HEBBARB e GEORGE, 2011), tanto com rações hiperlipídicas como com hipercalóricas (TAKAHASHI et al., 2012). Um modelo adequado para estudo deve ser prático para a investigação experimental, bem como apresentar características que definam a condição humana (LARTER & YEH, 2008; SUN & KARIN, 2012).

Um modelo experimental relevante para o desenvolvimento de NAFLD é o de Zou et al, 2006, citado por Hebbard e George (2011), em que ratos foram distribuídos em dois grupos alimentados com ração acrescida de solução salina (grupo controle) ou 1 mL de emulsão lipídica (grupo tratado), via intra-gástrica, durante 6 semanas, além de solução de sacarose à 18%. Os animais apresentaram aumento sérico de colesterol total, triacilgliceróis e TNF- α (Fator alfa de necrose tumoral), hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência à insulina, lesões mitocondriais e inflamação hepáticas.

A combinação dos impactos gerados pela NASH no fígado sobrecarrega mecanismos de sobrevivência de hepatócitos aumentando a taxa de mortalidade dos mesmos. Esse processo leva à ativação de meios para substituir essas células, como a ativação de células estreladas hepáticas em miofibroblastos, causando fibrose hepática, e a promoção da expansão de células ovas que produzem citocinas inflamatórias para recrutar diversos tipos de células imunes para o fígado (JOU, CHOI & DIEHL, 2008). Assim, as células ovas ou progenitoras hepáticas podem apresentar não só relação com a NASH como também com a origem do HCC a partir desta.

1.4 Quimioprevenção e β -ionona

Existem evidências de que a alimentação tem um papel fundamental na modulação de todos os estágios da carcinogênese, destacando-se entre outros fatores de risco (SUHR, 2003; ROSS, 2010). Nesse sentido, diversos estudos buscam elucidar como determinados alimentos e compostos bioativos presentes nos alimentos (CBAs) podem interferir no processo, com o objetivo de reduzir o risco de desenvolvimento de neoplasias (SPORN, 1994 ; ROSS, 2007).

Uma das observações mais importantes provenientes dos estudos com modelos de hepatocarcinogênese em animais é que nutrientes e CBAs podem modular o

desenvolvimento do HCC (HEIDOR et al, 2012). Deste modo, a quimioprevenção pode ser uma estratégia promissora para o controle de neoplasias e é definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos, com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de desenvolvimento de neoplasias (SPORN, 1976; SHUKLA, 2007). Dentre os inibidores da carcinogênese identificados até o momento, podem-se citar alguns derivados do metabolismo do mevalonato em plantas, denominados isoprenóides, em função de sua promissora ação relatada na quimioprevenção (MORENO et al., 1995; MO, ELSON, 2004; ESPINDOLA et al., 2005; CARDOZO et al., 2011; ONG et al, 2012; SCOLASTICI., 2014).

A beta-ionona (β I) é um sesquiterpeno presente na estrutura molecular do retinol, β -caroteno e ácido retinóico e pode ser encontrada em uvas e aromatizantes de vinhos (CARDOZO et al., 2011; ONG et al, 2012). A β I é conhecida por atuar em diversas atividades; dentre estas destacam-se sua ação quimiopreventiva e antioxidante. A β I atua na oxidação por meio da modulação enzimática dos sistemas antioxidativos reduzindo a oxidação lipídica (ASOKKUMAR et al, 2012).

É conhecida por ser quimiopreventiva em diversos tipos de neoplasias; entretanto, seu mecanismo de ação é pouco conhecido (JANAKIRAM et al, 2008; ONG et al, 2012; LIU et al, 2013). Em trabalhos prévios, observou-se atividade quimiopreventiva da β I quando administrada durante as fases de iniciação e promoção inicial da hepatocarcinogênese em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH. Esta atividade da β I foi atribuída à inibição da proliferação celular nas LPN e nas áreas sem alterações morfológicas ao redor das LPN (ESPÍNDOLA et al., 2005). De forma semelhante, atividade quimiopreventiva da β I foi observada também quando administrada somente durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese em ratos Wistar, devido à redução da proliferação celular em LPN, à indução da remodelação de LPN e inibição da HMGCoA redutase, essencial para a síntese do colesterol (CARDOZO et al., 2011). Assim, de forma semelhante ao beta-caroteno (MORENO et al, 1995), a capacidade da β I em reduzir a síntese do colesterol poderia estar relacionada à inibição pós-transcricional da HMG-CoA redutase, reduzindo, também, a síntese de intermediários da via do mevalonato, tais como pirofosfato de farnesila e geranilgeranila (ESPÍNDOLA et al, 2005; CARDOZO et al., 2011). No entanto, nesse sentido não foram encontrados estudos a respeito da ação da β I na NASH.

A primeira etapa na biossíntese de colesterol em animais é um conjunto de reações que se inicia com a formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) que é reduzida a mevalonato, sendo nesta etapa necessária a ação da enzima HMG-CoA redutase (GOLDSTEIN; BROWN, 2009). LPNs e neoplásicas hepáticas apresentam perda do

mecanismo de regulação inibitória da atividade da enzima HMG-CoA redutase (SIPERSTEIN, 1984).

Outro mecanismo que também influencia a HMG-CoA redutase compreende a ação dos genes INSIG. Estes foram originalmente identificados em 1991 como um mRNA induzido pelo tratamento com insulina em células H35 de hepatoma. O nome é derivado de sua descrição, em inglês, gene induzido por insulina (*insulin induced gene*) (BURG & ESPENSHADE, 2011). Quando os níveis de colesterol estão reduzidos, a transcrição do gene para HMG-CoA redutase é regulada pela ligação dos fatores de transcrição *sterol regulatory element binding proteins* (SREBPs) em seu promotor. Os SREBPs sofrem ativação proteolítica pela SCAP (*SREBP cleavage activating protein*), uma proteína politópica de membrana com um domínio de ligação de esterol que se associa aos precursores SREBP do retículo endoplasmático (RE) para o Golgi. Quando o nível de colesterol celular está elevado, SCAP se liga na proteína insig, o que retém SCAP e os precursores inativos SREBPs no RE, impedindo a geração de SREBPs transcricionalmente ativos (TSAI et al, 2012). Além disso, na presença de colesterol os INSIGs promovem a ubiquitinação da HMG-CoA redutase e recrutam a gp78 e outras proteínas envolvidas nesse processo, aumentando a degradação da HMG-CoA redutase (BURG & ESPENSHADE, 2011). Desse modo, os genes INSIG apresentam-se como um mecanismo relevante no controle dessa enzima de fundamental importância na patogênese da NAFLD.

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

Devido ao fato do desenvolvimento de NAFLD ser um fator associado ao processo de hepatocarcinogênese, isto facultaria-nos a hipótese de que a NAFLD contribuiria para a potencialização da hepatocarcinogênese, inclusive, por meio do aumento da quantidade de células ovas nas etapas de iniciação/promoção. Além disso, aventa-se a possibilidade da β I atuar como quimiopreventivo neste processo de associação NAFLD e HCC.

2. Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo investigar se a NAFLD potencializa o desenvolvimento de LPN em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH nas etapas de iniciação e seleção/promoção da hepatocarcinogênese, bem como se a administração de β -ionona apresenta atividade quimiopreventiva nesse processo.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos, albinos, da linhagem Wistar, com pesos iniciais compreendidos entre 90 e 110g e obtidos da colônia do biotério da Universidade de São Paulo (USP-SP).

O experimento foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, após aprovação do projeto pelo Comitê de ética em Pesquisa em Animais de Experimentação (Protocolo nº 458)

Os animais permaneceram durante todo o experimento nas seguintes condições: temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de iluminação claro-escuro de 12h, iniciando-se às 7hrs. Foram mantidos em gaiolas de polipropileno (não excedendo a 4 animais por caixa) com tampas de aço inoxidável e assoalho forrado com maravalha previamente esterilizada, trocada rotineiramente em dias alternados. Esses tiveram acesso à água filtrada e ração comercial peletizada para roedores de laboratório (Nuvilab CR-1; Nuvital Nutrientes S/A; Colombo/PR; Brasil) *ad libitum*, com controle de consumo de ração e massa corpórea diariamente. Os níveis garantidos de nutrientes, bem como os componentes adicionados por quilograma de produto pelo fabricante da ração encontram-se na fonte <http://www.sogorb.com.br/iframes/01-12-01.html>. Os animais receberam o mesmo lote da ração até o término do experimento.

3.2 Emulsão Hipercalórica

Os animais receberam, diariamente, além da ração, 1mL por 100g de peso corpóreo de emulsão hipercalórica via gástrica (i.g.) para indução de NAFLD segundo modelo estabelecido por Zou et al. (2006). A composição dessa emulsão se encontra na tabela 1.

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

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

Adaptado de Zou et al, 2006

3.3 Modelo do “Hepatócito Resistente”

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

A iniciação da carcinogênese ocorreu pela administração intraperitoneal de dose necrogênica do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN; Sigma, EUA; 20 mg/100 g de peso corpóreo [p.c.]) dissolvido em solução de NaCl a 0,9%. Após um período de recuperação de 2 semanas os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses únicas em dias consecutivos, por intubação gástrica, de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF; Sigma; 2 mg/100 g p.c.) dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho. Vinte e quatro horas após a última aplicação de 2-AAF os animais foram submetidos a um potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial (HP) a 70%. Para isto, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com éter etílico (Merck, Brasil). No pós operatório os animais receberam ácido acetilsalicílico 100 mg/kg via oral, misturado na água, como analgésico durante 3 dias.

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

3.4 Protocolo Experimental

Afim de verificar a influência do NAFLD em diferentes fases da hepatocarcinogênese, os animais foram alocados aleatoriamente em 6 diferentes grupos experimentais (**Figura 1**). A hepatocarcinogênese foi induzida em todos os animais utilizando o modelo do RH descrito por Solt e Farber (1976), modificado por Semple-Roberts et al. (1987) e adaptado para ratos Wistar por Moreno et al. (1991). A iniciação da carcinogênese ocorreu pela administração intraperitoneal de dose necrogênica do agente iniciante dietilnitrosamina (DEN; Sigma, EUA; 20 mg/100 g de peso corpóreo [p.c.]) dissolvido em solução de NaCl a 0,9%. Após um período de recuperação de 2 semanas os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses únicas em dias consecutivos, por intubação gástrica, de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF; Sigma; 1,5 mg/100 g p.c.) dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho. Vinte e quatro horas após a última aplicação de 2-AAF os animais foram submetidos a um potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial (HP) a 70%. Por fim, no quarto dia que sucedeu a HP os animais receberam via i.g. doses de 2-AAF (1 mg /100 g p.c., respectivamente) também dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho e foram eutanasiados na 13ª semana. Como demonstrado na Figura 1A, na fase de iniciação os animais do grupo NAFLD receberam, diariamente, 1 mL/100 g de peso corpóreo da emulsão hipercalórica via intra gástrica e os animais do grupo BI receberam 1 mL/100 g de peso corpóreo da emulsão acrescida de 16mg/100g de peso corpóreo de β -ionona até a sexta semana do experimento um dia antes da administração de DEN. Já na fase de seleção/promoção, Figura 1B, os animais do grupo NAFLD receberam a emulsão hipercalórica e os animais do grupo BI receberam a emulsão acrescida da β -ionona, a partir de um dia após a DEN. Os animais dos grupos RH da iniciação e da seleção/promoção servem como controles e receberam, diariamente, 1mL/100g peso corpóreo de água até a sexta semana do experimento (Figura 1A) e um dia após a DEN (Figura 1B), respectivamente.

Figura 1: Protocolo experimental do experimento de iniciação (A) e do experimento de seleção/promoção (B).

3.5 Eutanásia dos Animais e Coleta das Amostras

Os animais foram anestesiados com éter etílico em câmara saturada e a eutanásia se deu por meio de secção da aorta abdominal e consequente choque hipovolêmico. Antes da eutanásia, foi coletado sangue por punção cardíaca em tubos contendo EDTA e devidamente identificados. Após, as amostras foram centrifugadas para obtenção do plasma e o mesmo congelado em -80°C .

A seguir, o fígado foi retirado, lavado em solução salina gelada a 0,9% e pesado em balança eletrônica digital, seguindo-se, então, o exame macroscópico do mesmo. Por fim, foram coletados fragmentos hepáticos fixados em formalina tamponada a 10% por 24h e seguidos para processamento histológico ou congelados em nitrogênio líquido e conservados a -80°C para utilização de técnicas de biologia molecular. Após o processamento histológico (material fixado), cortes de 3 a 4 μm de espessura foram obtidos e utilizados para coloração com hematoxilina e eosina (HE), ou para marcação imunoistoquímica.

3.6 Determinação da Presença e do Grau de NAFLD

As análises histológicas foram realizadas pelo Prof. Luis Fernando Barbisan (UNESP Botucatu) em cortes hepáticos corados por H&E. Para as análises dos efeitos dos tratamentos na arquitetura hepática utilizou-se o sistema de escores de Kleiner adaptado para roedores e que avalia a gravidade da NAFLD (BRUCE et al., 2009). Considerou-se os escores individuais: grau de estratos (5% - 0; 5% a 33% - 1; 33% a 66% - 2; > 66% - 3 de comprometimento), hepatócitos balizados (nenhum - 0; poucos - 1; proeminentes - 2) e

inflamação lobular (nenhum - 0; 2 focos - 1; 2 a 4 focos - 2; > 4 focos - 3) de cada animal. O valor do score de Kleiner foi determinado pela somatória destes escores individuais (esteatose + hepatócitos balonizados + focos de inflamação). Quando o escore de Kleiner possui valores totais < 3 considerou-se NAFLD leve; 3 a 4, NAFLD moderada e > 5, NAFLD severa.

3.7 Exame Macroscópico dos Fígados

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

3.8 Marcação imunoistoquímica para GST-P e PCNA

O método utilizado para a realização da marcação imunoistoquímica para anti-GST-P (1:1000; MBL, Japão) e anti-PCNA (1:200, Abcam, Inglaterra) foi o da avidina-biotina (HSU; RAINE; FANGER, 1981), empregando-se, para tanto, anticorpos primários específicos. O sistema de revelação foi constituído de anticorpo secundário biotinilado universal juntamente com complexo de streptavidina ligado a peroxidase (Dako, Dinamarca) seguida da aplicação de diaminobenzidina (DAB). A especificidade das marcações foi controlada subtraindo-se o anticorpo primário e substituindo-o por albumina séria bovina (1% em PBS).

3.8.1 Procedimento para Identificação e Quantificação de LPN GST-P Positivas

O número (n/cm²), tamanho médio (mm²) e a porcentagem de área ocupada por LPNs GST-P positivas, pLPN (coloração homogênea e bordas regulares) ou rLPN (coloração heterogênea e bordas irregulares) (RIZZI et al., 1997; SILVEIRA et al., 2001; SCOLASTICI et al., 2014), bem como a área total dos fragmentos hepáticos foram determinados utilizando-se o sistema de análise de imagem AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha).

3.8.2 Quantificação da Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada pela contagem de números de células marcadas para PCNA por cm² no surrounding, em pLPN e em rLPN, em 10 regiões por lâmina e o resultado foi expresso em número de células/cm².

3.9 Quantificação de Corpúsculos Apoptóticos

Os hepatócitos em apoptose e corpos apoptóticos foram quantificados pelo método de H&E (LEVIN et al., 1999) utilizando-se microscópio (Axio Imager M2; Carls Zeiss; Alemanha). A apoptose foi avaliada pela contagem do número de corpúsculos apoptóticos por mm² no surrounding, em pLPN e em rLPN, em 10 regiões por lâmina e o resultado foi expresso em número de corpúsculos apoptóticos/cm². O número destes em cada grupo foi contado no surrounding, pLPN e rLPN. A leitura foi realizada varrendo-se toda a lâmina e o resultado foi expresso em número de hepatócitos em apoptose/cm² de surrounding, pLPN e rLPN.

3.10 Quantificação de células marcadas por Oil-Red

Os fígados dos animais foram cortados em criostado (Ag Protect, Leica) e submetidos a marcação com o corante Oil-Red. Foi preparada uma solução estoque de Oil Red-O com 300mg do corante Oil Red-O (Sigma) e 100mL de Isopropanol 99%. A partir dessa solução estoque foi preparada uma solução de uso com 3 partes da solução estoque de Oil Red-O e 2 partes de água MiliQ. Após fixação em solução de formalina 10% por 10 minutos, incubou-se as lâminas com isopropanol 60% (diluído em água MiliQ), durante 5 minutos. Após remover o isopropanol incubou-se as lâminas com solução de uso, durante 15 minutos, em temperatura ambiente. Removeu-se a solução de Oil Red-O e lavou-se com água destilada até a atingir uma coloração transparente da água. Realizou-se, por fim, contra-coloração com hematoxilina, lavou-se em água corrente e água destilada e montaram-se as lâminas em glicerina.

As células marcadas por Oil-Red foram avaliadas de forma semi-quantitativa, na forma de escores: ausência (0), poucas células (1), moderada (2), intermediária (3) e intensa (4).

3.11 Quantificação de β I no fígado

O conteúdo de β -ionona nos tecidos foi determinado pelo professor Eduardo Purgatto (USP), de acordo com Su et al. (2004) com adaptações. As amostras hepáticas provenientes de 5 animais de cada grupo foram homogeneizadas em um aparelho do tipo Potter com 200 μ L de etanol mais 10 ng de metil β -ionona (padrão interno – PI). Os homogenatos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000 g (4°C). Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para vials de injeção, dos quais 3

uL foram injetados um sistema de cromatografia à gás (modelo HP6890) acoplado a um detector seletivo de massas (modelo HP5973). A coluna empregada foi uma SupelcoWax 10 (30 mts x 0.25 mm diam. interno, 0.25 mm de espessura de filme). A injeção foi feita sem divisão de amostra (*Splitless*) com temperatura de 200°C. O gás de arraste utilizado foi hélio a um fluxo constante de 1 ml/min. A temperatura do forno foi inicialmente mantida a 50°C por 3 minutos e aumentada até 250°C a 20°C/minuto. O monitoramento do efluente da coluna foi feito em um detector do tipo quádruplo usando uma fonte de ionização do tipo impacto de elétrons a 70 eV com temperatura de 230°C. Os íons monitorados foram 177 e 206 para a β -ionona e 135 e 191 para o PI. Uma curva de calibração foi montada injetando de 0,1 a 10 ng de β -ionona, em vials contendo 10 ng de PI, cada. A relação de áreas β -ionona/PI foi montada utilizando o cromatograma extraído para o íon 177. Os cálculos do conteúdo de β -ionona foram baseados na mesma relação.

3.12 Quantificação de Colesterol Total, HDL, LDL, AST, ALT e Triglicerídeos

A determinação destes parâmetros foi realizada em um analisador bioquímico (Labmax 240), utilizando kits disponíveis comercialmente (Labtest).

3.13 Avaliação da Expressão Gênica de *Thy-1*, *Insig 1*, *Insig 2* e *Hmgcr* por RT-qPCR

Os experimentos de RT-qPCR foram utilizados seguindo as orientações do MIQE: Minimum Informative for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment (BUSTIN et al., 2009). A extração do RNA foi realizada com o kit Illustra RNAspin (GE, USA) segundo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNase (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Scientific, EUA). A transcrição reversa dos mRNAs obtidos do fígado foi realizada utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

Cada amostra de cDNA foi analisada com ensaios TaqMan (Life Technologies, EUA) contendo primers e sondas de hidrólise específicos para *Thy 1* (Applied Biosystems Rn00562048_m1), *Insig 1* (Applied Biosystems Rn000574380_m1), *Insig 2* (Applied Biosystems Rn00710111_m1), *Hmgcr* (Applied Biosystems Rn00565598_m1) e *Gapdh* (controle endógeno, Applied Biosystems 4352338E). Para cada reação foram utilizados 10 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2x) (Life

Technologies, EUA), 4µL do produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 20µL com água livre de nucleases.

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

3.14 Análise Estatística dos Dados

A distribuição dos dados obtidos em cada experimento foi analisada para determinar simetria, obliquidade (skewness), curtose e a extensão das variâncias. Os algoritmos de Modelos Lineares Gerais do programa STATA (Stata/IC 13.1 para MacOS, StataCorp TX, EUA) foram usados para avaliar os efeitos dos tratamentos apenas quando as condições de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos ajustados eram confirmadas. Alternativamente, comparações não paramétricas aos pares (teste de Wilcoxon) foram realizadas para detectar efeitos dos tratamentos quando as condições dos Modelos Lineares Gerais não eram atingidas. Tanto nas análises paramétricas quanto nas análises não paramétricas, foi considerado um nível de significância de 5% e foram reportados apenas os valores de p significativos. Além dos valores de p, foram reportados valores de ômega quadrado (ω^2) como medidas do tamanho de efeito.

4. Resultados

4.1 Evolução do Peso Corpóreo e do Consumo de Ração

4.1.1 Iniciação

A Figura 2 mostra os dados de evolução de peso corpóreo dos animais do experimento de iniciação. Nota-se que, durante os períodos de administração da DEN, de 2-AAF e do procedimento de HP a 70%, os animais dos grupos submetidos ao modelo do RH apresentaram perda de peso, o mesmo ocorrendo para o consumo de ração. Antes da administração de DEN, o consumo parece ser maior nos animais RH, porém essa diferença torna-se insignificante após iniciação do modelo RH. (Figura 3).

Figura 2: Evolução do peso de ratos Wistar dos grupos RH, NAFLD e BI durante a fase de iniciação do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”. Cada ponto representa a média da massa corporal do grupo correspondente nesse ponto de tempo. RH (n=6), NAFLD (n = 6) e BI (n=8).

Figura 3: Consumo de ração de ratos Wistar dos grupos RH, NAFLD e BI durante a fase de iniciação do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”. Cada ponto representa a média da massa corporal do grupo correspondente nesse ponto de tempo. RH (n=6), NAFLD (n = 6) e BI (n=8).

4.1.2 Seleção/Promoção

A Figura 4 mostra os dados de evolução de peso corpóreo dos animais do experimento de seleção/promoção. Observa-se que, durante os períodos de administração da DEN, de 2- AAF e do procedimento de HP a 70%, os animais dos grupos submetidos ao modelo do RH apresentaram perda de peso, o mesmo ocorrendo para o consumo de ração (Figura 5).

Figura 4: Evolução do peso de ratos Wistar dos grupos RH, NAFLD e BI durante a fase de seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”. Cada ponto representa a média da massa corporal do grupo correspondente nesse ponto de tempo. RH (n=6), NAFLD (n = 7) e BI (n=5).

Figura 5: Consumo de ração de ratos Wistar dos grupos RH, NAFLD e BI durante a fase de seleção/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “Hepatócito Resistente”. Cada

ponto representa a média da massa corporal do grupo correspondente nesse ponto de tempo. RH (n=6), NAFLD (n =7) e BI (n=5).

4.2 Peso Hepático Relativo dos Animais

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao peso hepático relativo no experimento de iniciação. Observou-se um aumento do peso hepático no grupo NAFLD quando comparado com o grupo RH e um aumento ainda mais acentuado no grupo BI quando comparado ao grupo NAFLD (Figura 6).

Figura 6: Peso hepático relativo dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Os pontos representam a média de cada tratamento e as barras de erro correspondem ao erro padrão da média (EPM). Os grupos foram comparados por contrastes de modelos lineares gerais. *a*: diferença estatística significativa em relação ao grupo RH ($p < 0,01$; $\omega^2 = 0,938$); *b*: diferença estatística significativa em relação ao grupo NAFLD ($p < 0,01$; $\omega^2 = 0,938$). Iniciação: RH (n=6), NAFLD (n =6) e BI (n=8); Seleção/promoção: RH (n=6), NAFLD (n =7) e BI (n=5).

4.3 Análise Histológica do Fígado dos Animais

Não foi observada presença de esteatose no fígado dos animais do experimento de iniciação.

Foi analisada a presença de NAFLD no fígado dos animais do experimento de seleção/promoção por meio da avaliação do grau de esteatose, de inflamação e presença de hepatócitos balizados (Anexo 1) que resultaram no escore de Kleiner (Bruce et al., 2009). O grupo NAFLD apresentou escore de 2,75 e o grupo BI 2,00 (Figura 7).

Segundo Kleiner et al (Kleiner et al., 2005) valores relativos ao escore total inferiores a 3 são classificados como NAFLD leve, de 3 a 4 moderadas e superiores a 5 como NASH. De acordo com o escore de Kleiner os animais do experimento de seleção/promoção do grupo NAFLD e BI apresentaram grau de esteatose leve (Anexo III).

Figura 7: Escore de Kleiner dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Cada ponto representa o escore de um animal e a linha de cada coluna corresponde a mediana do grupo. Os dados foram avaliados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Não houve diferença significativa. Seleção/promoção: RH (n = 6), NAFLD (n = 7) e BI (n = 5).

4.4 Níveis Séricos de Triglicerídeos, Colesterol Total, c-HDL, c-LDL dos Animais

Em relação aos parâmetros de ALT e AST não foram encontradas diferenças estatísticas no experimento de iniciação, bem como no de seleção/promoção. Na concentração plasmática de fosfatase alcalina não observou-se diferença estatística na fase de iniciação e, na fase de seleção/promoção, o grupo NAFLD apresentou um aumento quando comparado ao grupo RH. Observou-se um aumento de triacilgliceróis no grupo NAFLD quando comparado ao grupo RH na fase de iniciação, não havendo diferença estatística na fase de seleção/promoção. Nos parâmetros de colesterol total e colesterol LDL, o grupo NAFLD mostrou aumento nas concentrações com relação ao grupo RH nas fases de iniciação e seleção/promoção. Por fim, o grupo NAFLD apresentou diminuição das

concentrações de colesterol HDL quando comparado ao grupo RH e diminuição no grupo BI em relação ao grupo NAFLD na fase de seleção/promoção. Não houve diferença estatística nas concentrações de colesterol HDL na fase de iniciação (**Figura 8**).

Figura 8: Níveis sérios de ALT, AST, fosfatase alcalina, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol HDL e colesterol LDL dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. As barras correspondem a média de cada tratamento e as linhas de erro mostram o EPM. Os tratamentos foram comparados por contrastes de modelos lineares gerais. Os valores de p das comparações que não foram significativas não foram mostradas nos gráficos. Iniciação: RH (n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5); Seleção/Promoção: RH (n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5).

4.5 Macroscopia dos Animais

Não houve diferença estatística na incidência e na multiplicidade no experimento de iniciação (Tabela 2), bem como no experimento de seleção/promoção (Tabela 3) (Anexo I).

Tabela 2: Incidência e multiplicidade dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH), NAFLD e BI na fase de iniciação da hepatocarcinogênese.

Grupos	Número de ratos com nódulos	Incidência (%)	Multiplicidade
RH	5 (6)	83,33%	2,84
NAFLD	6 (6)	100,00%	3,29
BI	7 (8)	87,50%	1,78

Tabela 3: Incidência e multiplicidade dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH), NAFLD e BI na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese.

Grupos	Número de ratos com nódulos	Incidência (%)	Multiplicidade
RH	4 (6)	66,66%	0,56
NAFLD	4 (7)	57,14%	3,44
BI	3 (5)	60,00%	2,88

4.6 Morfometria dos Animais

4.6.1 Número de Lesões Pré Neoplásicas

Não foi observada diferença estatística no número de LPN totais, tanto no experimento de iniciação quanto no de seleção/promoção. Houve uma diminuição no número de LPN persistentes no grupo BI quando comparado ao grupo NAFLD. Não houve diferença em LPN persistente na fase de seleção/promoção. Já em LPN em remodelação, observou-se um aumento no grupo BI quando comparado ao NAFLD tanto no experimento de iniciação quanto no de seleção/promoção (Figura 9) (Anexo IV).

Figura 9: Número de lesões pré neoplásicas totais, persistentes e em remodelação dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. A figura corresponde a uma análise gráfica de “box and whiskers” segundo o método de Tukey. Cada caixa representa o 95% dos dados (intervalo interquartil) de cada grupo de tratamento. A linha horizontal dentro de cada caixa mostra a mediana de cada grupo e as linhas verticais fora das caixas mostram a extensão dos valores extremos. Os pontos são considerados outliers. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados por comparações não paramétricas aos pares pelo teste de Wilcoxon. Os valores de p estatisticamente significativos se mostram na figura. Iniciação: RH (n = 6), NAFLD (n = 6) e BI (n = 8); Seleção/promoção: RH (n = 6), NAFLD (n = 7) e BI (n = 5).

4.6.2 Área Média de Lesões Pré Neoclássicas

No parâmetro de área média de LPN, observou-se uma diminuição de LPN totais e LPN persistentes no grupo NAFLD quando comparado ao RH na fase de seleção/promoção, não sendo observadas diferenças estatísticas na fase de iniciação. Não houveram diferenças em LPN em remodelação nos experimento de iniciação e seleção/promoção (Figura 10) (Anexo IV).

Figura 10: Área média de lesões pré neoclássicas totais, persistentes e em remodelação dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. A figura corresponde a uma análise gráfica de “box and whiskers” segundo o método de Tukey. Cada caixa representa o 95% dos dados (intervalo interquartil) de cada grupo de tratamento. A linha horizontal dentro de cada caixa mostra a mediana de cada grupo e as linhas verticais fora das caixas mostram a extensão dos valores extremos. Os pontos são considerados outliers. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados por comparações não paramétricas aos pares pelo teste de Wilcoxon. Os valores de p estatisticamente significativos se mostram na figura. Iniciação: RH (n = 6), NAFLD (n = 6) e BI (n = 8); Seleção/promoção: RH (n = 6), NAFLD (n = 7) e BI (n = 5).

4.6.3 Porcentagem da Área do Corte Ocupada por Lesões Pré Neoplásicas

No experimento de seleção/promoção, houve uma diminuição da porcentagem da área do corte ocupada por LPNs totais no grupo NAFLD quando comparado ao grupo RH; não houve diferença entre os grupos no experimento de iniciação. Não foram observadas diferenças nos experimento de iniciação e seleção/promoção na área ocupada por LPN persistente. Já na porcentagem de área ocupada por LPN em remodelação observou-se uma diminuição no grupo NAFLD quando comparado ao grupo RH e um aumento no grupo BI quando comparado ao grupo NAFLD (Figura 11) (Anexo IV).

Figura 11: Porcentagem da área do corte ocupada por lesões pré neoclássicas totais, persistentes e em remodelação dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. A figura corresponde a uma análise gráfica de “box and whiskers” segundo o método de Tukey. Cada caixa representa o 95% dos dados (intervalo interquartil) de cada grupo de tratamento. A linha horizontal dentro de cada caixa mostra a mediana de cada grupo e as linhas verticais fora das caixas mostram a extensão dos valores extremos. Os pontos são considerados outliers. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados por comparações não paramétricas aos pares pelo teste de Wilcoxon. Os valores de p estatisticamente significativos se mostram na

figura. Iniciação: RH (n = 6), NAFLD (n = 6) e BI (n = 8); Seleção/promoção: RH (n = 6), NAFLD (n = 7) e BI (n = 5).

4.7 Proliferação Celular no Fígado dos Animais

No experimento de iniciação observou-se, no surrounding, um aumento na proliferação celular no grupo NAFLD em relação ao grupo RH e uma diminuição no grupo BI em relação ao grupo NAFLD. Em LPN persistentes e em remodelação houve um aumento no grupo NAFLD em relação ao grupo RH e não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos BI e NAFLD (Figura 12) (Anexo IV). O mesmo foi observado no experimento de seleção/promoção (Figura 13) (Anexo IV).

Figura 12: Proliferação celular em cortes histológicos de fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação da hepatocarcinogênese.

PCNA-Seleção/Promoção

Figura 13: Proliferação celular em cortes histológicos de fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese.

4.8 Apoptose

4.8.1 Iniciação

Observou-se maior ($p < 0,05$) número de corpúsculos apoptóticos em pLPN do grupo NAFLD quando comparado ao grupo RH, porém sem diferença ($p \geq 0,05$) entre os grupos BI e NAFLD (**Figura 14**). Não houve diferença ($\geq 0,05$) do número de corpúsculos apoptóticos no surrounding e rLPN entre os grupos.

Figura 14: Quantificação do índice apoptótico do fígado de animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH n=5), NAFLD (n=5) e BI (n=5) na fase de iniciação da hepatocarcinogênese. Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de NAFLD ($p < 0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.

4.8.2 Seleção/Promoção

Observou-se maior ($p < 0,05$) número de corpúsculos apoptóticos em pLPN do grupo NAFLD quando comparado ao grupo RH, porém sem diferença ($p \geq 0,05$) entre os grupos BI e NAFLD (**Figura 15**). Não houve diferença ($\geq 0,05$) do número de corpúsculos apoptóticos no *surrounding* e rLPN entre os grupos.

Figura 15: Quantificação do índice apoptótico do fígado de animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5) na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de NAFLD ($p < 0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.

4.9 Quantificação de gordura hepática

4.9.1 Iniciação

Não foi observada diferença de score de células marcadas com oil red em animais do experimento de iniciação.

Figura 16: Quantificação da marcação do fígado de animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH n = 5), NAFLD (n = 5) e BI (n = 5) na fase de iniciação da hepatocarcinogênese. As barras representam a mediana de cada grupo de tratamento. As comparações foram feitas aos pares pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.

4.9.2 Seleção/Promoção

Observou-se maior ($p < 0,05$) score de células marcadas com oil red em animais do grupo NAFLD quando comparado ao grupo RH, porém sem diferença ($p \geq 0,05$) entre os grupos BI e NAFLD (**Figura 17**).

Figura 17: Quantificação da marcação do fígado de animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH n=5), NAFLD (n=5) e BI (n=5) na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. As barras representam a mediana de cada grupo de tratamento. As comparações foram feitas aos pares pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.

4.10 Quantificação de BI

4.10.1 Iniciação

A concentração hepática de BI no grupo BI apresentou-se maior ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo NAFLD (**Figura 18**). Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os grupos NAFLD e RH em relação à concentração hepática de BI.

Figura 18: Concentração hepática de beta ionona (BI) de fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH $n = 5$), NAFLD ($n = 5$) e BI ($n = 5$) na fase de iniciação da hepatocarcinogênese. Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de NAFLD ($p < 0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.

4.10.2 Seleção/Promoção

A concentração hepática de BI no grupo BI apresentou-se maior ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo NAFLD (**Figura 19**). Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os grupos NAFLD e RH em relação à concentração hepática de BI.

Figura 19: Concentração hepática de beta ionona (BI) de fígado dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente (RH $n = 5$), NAFLD ($n = 5$) e BI ($n = 5$) na fase de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Dados expressos como média $\pm$ EPM a - diferente de NAFLD ($p < 0,05$), ANOVA seguido de teste Duncan.

4.11 Escore de Células Ovais

Não houve diferença estatística no escore de células ovas entre os grupos na fase de iniciação. Já na fase de seleção/promoção observou-se uma diminuição de células ovas no grupo BI quando comparado ao grupo NAFLD (Figura 14) (Anexo II).

Figura 20: Escore de células ovais dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. As barras representam a mediana de cada grupo de tratamento. As comparações foram feitas aos pares pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Iniciação: RH (n = 6), NAFLD (n = 6) e BI (n = 8); Seleção/promoção: RH (n = 6), NAFLD (n = 7) e BI (n = 5).

4.12 Expressão Gênica de *Thy1*, *Insig 1*, *Insig 2*, e *Hmgcr* dos Animais

Não houveram diferenças estatísticas nas expressões de *Hmgcr*, de *Insig 1*, *Insig 2* e *Thy 1* entre os grupos do experimento de iniciação (Figura 14).

No experimento de promoção, não houveram diferenças estatísticas nas expressões de *Thy1* e de *Insig 2* entre os grupos. Com relação ao gene *Hmgcr*, o grupo BI apresentou maior expressão quando comparado ao grupo NAFLD. Já o gene *Insig 1* apresentou maior expressão no grupo NAFLD quando comparado ao RH (Figura 15).

Figura 21: Expressão gênica de *Hmgcr*, *Insig1*, *Insig2* e *Thy1* quantificada pela técnica de RT-qPCR dos animais submetidos ao modelo hepatócito resistente, NAFLD e BI na fase de iniciação e de seleção/promoção da hepatocarcinogênese. Os gráficos de dispersão mostram a expressão relativa em Fold Change calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Cada ponto no gráfico representa um animal e as linhas horizontais de cada coluna de dispersão mostra a mediana do grupo de tratamento. As comparações aos pares foram realizadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Apenas no caso de diferenças estatísticas significativas, os valores de p são reportados. Iniciação: RH (n=5), NAFLD (n=5) e BI (n=5); Seleção/Promoção: RH (n=5), NAFLD (n=5) e BI (n=5).

5. Discussão

A NAFLD é conhecida como a manifestação hepática da síndrome metabólica (LOOMBA & SANYAL, 2013). Embora em indivíduos com obesidade o risco de desenvolvimento da NAFLD esteja aumentando (DOWMAN et al., 2011; LEUNG et al., 2015), a presença da doença é também observada em indivíduos eutróficos (LOOMBA & SANYAL, 2013). A incidência de NAFLD aumentou significativamente no mundo tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (LOOMBA & SANYAL, 2013; BETTERMANN, HOHENSEE & HAYBAECK, 2014) sendo recentemente considerada um dos principais fatores relacionados a doenças hepáticas crônicas (WREE et al., 2013; GERHARD & DISTEFANO, 2015).

O acúmulo hepático de lipídeos é a principal característica da presença da NAFLD (MICHELOTTI et al, 2013). Entretanto, o desenvolvimento desta doença envolve também outros fatores metabólicos, como, resistência à insulina, estresse oxidativo e inflamação (WREE et al, 2013). Devido a esta complexidade, a patogênese da NAFLD ainda é pouco compreendida (NAIK, KOSIR & ROZMAN, 2013). Dessa forma, os modelos de NAFLD em animais são fundamentais para elucidar os mecanismos de patogênese e avaliar possíveis agentes preventivos e terapêuticos (TAKAHASHI et al., 2012). Estes devem ser reprodutíveis, confiáveis, simples, acessíveis e tecnicamente disponíveis (KUCERA & CERVINKOVA, 2014).

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

As rações deficientes em colina e/ou metionina são capazes de desenvolver NAFLD induzindo esteatose hepática grave, necro-inflamação e fibrose (HEBBARB & GEORGE, 2011). Entretanto a principal desvantagem de utilização desses modelos é que o perfil metabólico é oposto ao observado em humanos, ou seja, reduzidos níveis de glicose em jejum, insulina e leptina, sensibilidade periférica à insulina e adiponectinas em níveis basais (TAKAHASHI et al, 2012). Já o uso de rações hiperlipídicas e hipercalóricas os animais apresentam esteatose e inflamação hepática, estresse oxidativo e fibrose, além de simular os parâmetros metabólicos encontrados em humanos (HEBBARB & GEORGE, 2011).

A administração intragástrica de emulsão hiperlipídica desenvolvido por Zou e colaboradores (2006) durante seis semanas também tem sido utilizada como modelo para a indução de NAFLD (HEBBARB & GEORGE, 2011; LI et al, 2011). Este modelo resulta no aumento sérico de colesterol total, triacilgliceróis e TNF-alfa, hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência à insulina, lesões mitocondriais e inflamação hepática em ratos Sprague-Dawley, sendo, portanto, um modelo relevante para o estudo de NAFLD. Além disso, a administração via intragástrica possibilita o controle preciso da ingestão de lipídeos.

De acordo com a literatura, há uma relação entre NAFLD e aumento do risco de desenvolvimento de HCC (MICHELOTTI et al, 2013). Entretanto, são poucos os estudos que analisam esta interação em fases precoces da hepatocarcinogênese (WANG, 2009). Por esse motivo, no presente estudo avaliou-se o desenvolvimento de NAFLD associado ao modelo RH, afim de se verificar uma possível potencialização nas fases de iniciação e seleção/promoção da hepatocarcinogênese e analisou-se, também, a atividade quimiopreventiva da BI nesta associação, visto que estudos anteriores do grupo mostraram que este isoprenóide apresenta potencial quimiopreventivo no modelo do RH (DE MOURA ESPINDOLA et al, 2005; CARDOZO et al, 2011; SCOLASTICI et al, 2014).

Ratos Wistar foram eutanasiados após 13 semanas da administração da emulsão hiperlipídica e observou-se presença de esteatose nos animais do experimento de seleção/promoção pela análise do score de Kleiner. A adição de BI atenuou o desenvolvimento de NAFLD.

No experimento de iniciação não foram observados presença de esteatose no fígado, pois a emulsão foi administrada até a sexta semana do experimento para esses animais, havendo assim um retrocesso da esteatose até a terceira semana de experimento.

Na presença de NAFLD, o fígado apresenta acúmulo de diversos tipos de lipídeos que causam esteatose (MICHELOTTI et al, 2013). Dentre estes, os níveis elevados de colesterol merecem destaque uma vez que parecem estar relacionados com a resposta inflamatória no fígado (WALENBERGH et al, 2013). Além disso, o colesterol pode atuar em mecanismos importantes da carcinogênese, como progressão do ciclo celular, diferenciação e proliferação celular (YEGANEH et al, 2014). A NAFLD está associada com o aumento de níveis séricos de LDL e triacilgliceróis, acompanhado da diminuição de HDL (TACER & ROZMAN et al, 2011). Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a ação da BI no contexto de iniciação e seleção/promoção da

hepatocarcinogênese. No presente estudo, a BI não modulou os níveis sérios de colesterol, de TGs, LDL, aumentou os níveis de HDL.

A associação da administração de emulsão hiperlipídica com o modelo RH resultou, no experimento de iniciação, em relação ao parâmetro de microscopia, uma sugestiva potencialização do modelo demonstrada pelo aumento marginal na incidência, multiplicidade e porcentagem de nódulos do grupo NAFLD em relação ao grupo RH. Já no experimento de seleção/promoção, a incidência diminuiu sensivelmente, aumentou o número de nódulos e aumentou a porcentagem de nódulos no grupo NAFLD em relação ao grupo RH. Em relação a microscopia, no experimento de iniciação não houveram diferenças significativas e no experimento de seleção/promoção houve uma diminuição na área média de LPN persistentes e na porcentagem de área de LPNs totais e LPNs em remodelação. Deste modo, no experimento de seleção/promoção, a dieta hiperlipídica pode estar retardando o desenvolvimento de LPNs, como observado no estudo de DUAN (2014).

A BI tem potencial quimiopreventivo em diversas células tumorais como de mama, cólon, gástrico, melanoma e leucemia (LIU et al, 2010). Além disso, este composto é capaz de inibir o processo de carcinogênese hepática (SCOLASTICI et al, 2014) e mamária (LIU et al, 2010). No presente estudo, no parâmetro de microscopia, não foram observadas diferenças estatísticas no grupo BI em relação ao grupo NAFLD. Na microscopia, no experimento de iniciação, a BI reduziu o número de LPN persistente, assim como em nossos estudo prévios (DE MOURA ESPÍNDOLA et al, 2005; CARDOZO et al, 2010). Esta diminuição pode estar relacionada à capacidade da BI de inibir enzimas responsáveis pelo bloqueio e estimular enzima de detoxificação de carcinógenos, enzimas de fase I e II, respectivamente (DE-OLIVEIRA, FIDALGO-NETO & PAUMGARTTEN, 1999; KUNO & MIZUTANI et al, 2005). A diminuição das pLPN, pode ainda estar relacionada a capacidade da BI em modular proteínas chaves no processo de carcinogênese, como p53, NF-KB e TGF-alfa, que estão alterados já e fases pré-neoplásicas (SCOLASTICI et al., 2014). Além disso, no experimento de iniciação, a BI aumentou o número de LPN em remodelação em relação ao grupo NAFLD. No experimento de seleção/promoção, a BI aumentou número e a porcentagem de área ocupada por LPN em remodelação.

Embora a BI apresente a capacidade de modular tanto a proliferação celular quanto a apoptose (Liu et al, 2004, Huang et al, 2010, Janakiram et al, 2010, Jones et al, 2013) “*in vitro*”, em nosso estudo “*in vivo*” não houve diferença na apoptose no grupo tratado com este isoprenóide. Em relação a proliferação celular, não houveram diferenças estatísticas no grupo BI em relação ao grupo NAFLD em LPN persistentes e em LPN em remodelação, apenas em surrounding, tanto no experimento de iniciação quanto no de seleção/promoção.

No experimento de seleção/promoção, a BI reduziu o score de células ovais, sugerindo-se que tenha ocorrido uma inibição da proliferação das células ovais nos animais do grupos BI. Porém

na expressão de Thy1 (SUKOWATI et al, 2013; XU et al, 2015), marcador de células ovais, não foi possível observar essa diminuição. A administração de 2-AAF seguida pela HP inibe a proliferação de hepatócitos maduros e ativa a proliferação de células ovais (PETERSEN, ZAJAC & MICHALOPOULOS, 1998). Estas podem se diferenciar em hepatócitos maduros e células epiteliais biliares, afim de regenerar a massa de fígado ou podem dar origem a câncer stem cells (XIANG et al, 2012). Deste modo, é possível que a BI tenha induzido o processo de diferenciação das células ovais uma vez que houve redução do escore destas células no grupo BI.

6. Conclusão

Nos experimentos nas fases de iniciação e seleção/promoção a NAFLD potencializou o desenvolvimento de LPNs e a BI apresentou atividade quimiopreventiva, porém mais estudos são necessários para elucidar mecanismos de ação.

7. Referências Bibliográficas

1. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
2. Andersen JB, Loi R, Perra A, Factor VM, Ledda-Columbano GM, Columbano A, et al. Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat. *Hepatology*. 2010;51(4):1401-9.
3. Asokkumar S, Naveenkumar C, Raghunandhakumar S, Kamaraj S, Anandakumar P, Jagan S, et al. Antiproliferative and antioxidant potential of beta-ionone against benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Mol Cell Biochem*. 2012;363(1-2):335-45.
4. Bannasch P, Haertel T, Su Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. *Toxicol Pathol*. 2003;31(1):134-9.
5. Bettermann K, Hohensee T, Haybaeck J. Steatosis and steatohepatitis: complex disorders. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):9924-44.
6. Bieghs V, van Gorp PJ, Walenbergh SM, Gijbels MJ, Verheyen F, Buurman WA, et al. Specific immunization strategies against oxidized low-density lipoprotein: a novel way to reduce nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2012;56(3):894-903.
7. Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2010;16(29):3603-15.
8. Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, et al. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology*. 2009;50(6):1796-808.
9. Buendia MA, Neuveut C. Hepatocellular carcinoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(2):a021444.
10. Burg JS, Espenshade PJ. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res*. 2011;50(4):403-10.
11. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
12. Cardozo MT, de Conti A, Ong TP, Scolastici C, Purgatto E, Horst MA, et al. Chemopreventive effects of beta-ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. *J Nutr Biochem*. 2011;22(2):130-5.
13. Chen Z, Sui J, Zhang F, Zhang C. Cullin family proteins and tumorigenesis: genetic association and molecular mechanisms. *J Cancer*. 2015;6(3):233-42.
14. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. 2012;142(4):711-25 e6.
15. Darwiche H, Oh SH, Steiger-Luther NC, Williams JM, Pintilie DG, Shupe TD, et al. Inhibition of Notch signaling affects hepatic oval cell response in rat model of 2AAF-PH. *Hepat Med*. 2011;3:89-98.
16. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
17. de Moura Espindola R, Mazzantini RP, Ong TP, de Conti A, Heidor R, Moreno FS. Geranylgeraniol and beta-ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation,

- total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kappaB activation. *Carcinogenesis*. 2005;26(6):1091-9.
18. De-Oliveira AC, Fidalgo-Neto AA, Paumgartten FJ. In vitro inhibition of liver monooxygenases by beta-ionone, 1,8-cineole, (-)-menthol and terpineol. *Toxicology*. 1999; 135(1):33-41.
 19. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM*. 2010;103(2):71-83.
 20. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33(5):525-40.
 21. Duan XY, Pan Q, Yan SY, Ding WJ, Fan JG, Qiao L. High-saturate-fat diet delays initiation of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:195.
 22. Durazzo M, Belci P, Collo A, Grisoglio E, Bo S. Focus on therapeutic strategies of nonalcoholic Fatty liver disease. *Int J Hepatol*. 2012;2012:464706.
 23. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2011;365(12):1118-27.
 24. Farber E. Clonal adaptation during carcinogenesis. *Biochem Pharmacol*. 1990;39(12):1837-46.
 25. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):143-53.
 26. Feo F, Frau M, Pascale RM. Interaction of major genes predisposing to hepatocellular carcinoma with genes encoding signal transduction pathways influences tumor phenotype and prognosis. *World J Gastroenterol*. 2008;14(43):6601-15.
 27. Fitamant J, Kottakis F, Benhamouche S, Tlan HS, Chuvain N, Parachoniak CA, et al. YAP inhibition restores hepatocyte differentiation in advanced HCC leading to tumor regression. *Cell Rep*. 2016 1247(15):2211.
 28. Fon Tacer K, Rozman D. Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *J Lipids*. 2011;2011:783976.
 29. Freedman ND, Marrero JA. Can dietary fish intake prevent liver cancer? *Gastroenterology*. 2012;142(7):1411-3.
 30. Gerhard GS, DiStefano JK. Micro RNAs in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2015;7(2):226-34.
 31. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(4):431-8.
 32. Guerrierio AL, Colvin RM, Schwartz AK, Molleston JP, Murray KF, Diehl A, et al. Choline intake in a large cohort of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(4):892-900.
 33. INCA, Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, p. 124, 2014.
 34. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
 35. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
 36. Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(1):35-44.
 37. Heidor R, Ortega JF, de Conti A, Ong TP, Moreno FS. Anticarcinogenic actions of tributyrin, a butyric acid prodrug. *Curr Drug Targets*. 2012;13(14):1720-9.
 38. Higashi K, Hiai H, Higashi T, Muramatsu M. Regulatory mechanism of glutathione S-transferase P-form during chemical hepatocarcinogenesis: old wine in a new bottle. *Cancer Lett*. 2004;209(2):155-63.
 39. Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis*. 2010;30(1):35-51.

40. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol.* 1981;75(6):816-21.
41. Janakiram NB, Cooma I, Mohammed A, Steele VE, Rao CV. Beta-ionone inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats, suppresses cell growth, and induces retinoid X receptor-alpha in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(1):181-90.
42. Jones S, Fernandes NV, Yeganehjoo H, Katuru R, Qu H, Yu Z, et al. beta-ionone induces cell cycle arrest and apoptosis in human prostate tumor cells. *Nutr Cancer.* 2013;65(4):600-10.
43. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2008;28(4):370-9.
44. Khazaei S, Salehiniya H, Mohammadian-Hafshejani A. Some facts about cancer in the world using registered cancer in 2012. *Iran J Public Health.* 2015;44(11):1559-1560.
45. Kucera O, Cervinkova Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol.* 2014;20(26):8364-76.
46. Kuno N, Mizutani T. Influence of synthetic and natural food dyes on activities of CYP2A6, UGT1A6, and UGT2B7. *J Toxicol Environ Health A.* 2005;68(16):1431-44.
47. Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(11):1635-48.
48. Lefever S, Hellemans J, Pattyn F, Przybylski DR, Taylor C, Geurts R, et al. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(7):2065-9.
49. Li P, Robertson TA, Thorling CA, Zhang Q, Fletcher LM, Crawford DH, et al. Hepatic pharmacokinetics of cationic drugs in a high-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(4):571-9.
50. Liu JR, Dong HW, Sun XR, Wang Q, Sun WG, Parry JW, et al. Effects of beta-ionone on mammary carcinogenesis and antioxidant status in rats treated with DMBA. *Nutr Cancer.* 2010;62(1):58-65.
51. Liu P, Gan W, Guo C, Xie A, Gao D, Guo J, et al. Akt-mediated phosphorylation of XLF impairs non-homologous end-joining DNA repair. *Mol Cell.* 2015;57(4):648-61.
52. Liu Q, Dong HW, Sun WG, Liu M, Ibla JC, Liu LX, et al. Apoptosis initiation of beta-ionone in SGC-7901 gastric carcinoma cancer cells via a PI3K-AKT pathway. *Arch Toxicol.* 2013;87(3):481-90.
53. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
54. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2003;362(9399):1907-17.
55. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3):776-81.
56. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(11):686-90.
57. Luch A. Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(2):113-25.
58. Marquardt JU, Thorgeirsson SS. Stem cells in hepatocarcinogenesis: evidence from genomic data. *Semin Liver Dis.* 2010;30(1):26-34.
59. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.* 2013;501(7467):328-37.
60. Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(11):656-65.
61. Mishra L, Banker T, Murray J, Byers S, Thenappan A, He AR, et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2009;49(1):318-29.

62. Mo H, Elson CE. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med* (Maywood). 2004;229(7):567-85.
63. Moreno FS, Rizzi MB, Dagli ML, Penteado MV. Inhibitory effects of beta-carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis*. 1991;12(10):1817-22.
64. Moreno FS, Rossiello MR, Manjeshwar S, Nath R, Rao PM, Rajalakshmi S, et al. Effect of beta-carotene on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. *Cancer Lett*. 1995;96(2):201-8.
65. Naik A, Kosir R, Rozman D. Genomic aspects of NAFLD pathogenesis. *Genomics*. 2013;102(2):84-95.
66. Naves MM, Silveira ER, Dagli ML, Moreno FS. Effects of beta-carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat(1). *J Nutr Biochem*. 2001;12(12):685-92.
67. Odoux C, Fohrer H, Hoppo T, Guzik L, Stolz DB, Lewis DW, et al. A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer. *Cancer Res*. 2008;68(17):6932-41.
68. Oishi N, Wang XW. Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells. *Int J Biol Sci*. 2011;7(5):517-35.
69. Ong TP, Cardozo MT, de Conti A, Moreno FS. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis with dietary isoprenic derivatives: cellular and molecular aspects. *Curr Cancer Drug Targets*. 2012;12(9):1173-90.
70. Peters U, Suratt BT, Bates JHT, Dixon AE. Beyond body mass index – Obesity and lung disease. *Chest*. 2017, doi: 10.1016/j.chest.2017.07.010.
71. Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology*. 1998;27(2):433-45.
72. Pitot HC. Animal models of neoplastic development. *Dev Biol (Basel)*. 2001;106:53-7; discussion 7-9, 143-60.
73. Pitot HC. Adventures in hepatocarcinogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2007;2:1-29.
74. Rizzi MB, Dagli ML, Jordao AA, Jr., Penteado MV, Moreno FS. beta-carotene inhibits persistent and stimulates remodeling gamma GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. *Int J Vitam Nutr Res*. 1997;67(6):415-22.
75. Roskams T. Relationships among stellate cell activation, progenitor cells, and hepatic regeneration. *Clin Liver Dis*. 2008;12(4):853-60, ix.
76. Ross SA. Nutritional genomic approaches to cancer prevention research. *Exp Oncol*. 2007;29(4):250-6.
77. Ross SA. Evidence for the relationship between diet and cancer. *Exp Oncol*. 2010;32(3):137-42.
78. Sarnow P, Jopling CL, Norman KL, Schutz S, Wehner KA. MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(9):651-9.
79. Schulz PO, Ferreira FG, Nascimento Mde F, Vieira A, Ribeiro MA, David AI, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease and liver cancer. *World J Gastroenterol*. 2015;21(3):913-8.
80. Scolastici C, de Conti A, Cardozo MT, Ong TP, Purgatto E, Horst MA, et al. beta-ionone inhibits persistent preneoplastic lesions during the early promotion phase of rat hepatocarcinogenesis: TGF-alpha, NF-kappaB, and p53 as cellular targets. *Nutr Cancer*. 2014;66(2):234-41.
81. Semple-Roberts E, Hayes MA, Armstrong D, Becker RA, Racz WJ, Farber E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. *Int J Cancer*. 1987;40(5):643-5.

82. Shukla Y, Kalra N. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. *Cancer Lett.* 2007;247(2):167-81.
83. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(1):10-29.
84. Silva-Oliveira EM, Fernandes PA, Moraes-Santos T. Effect of coffee on chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Nutr Cancer.* 2010;62(3):336-42.
85. Silveira ER, Naves MM, Vannucchi H, Jordao Junior AA, Dagli ML, Moreno FS. Vitamin A and all-trans and 9-cis retinoic acids inhibit cell proliferation during the progression phase of hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Nutr Cancer.* 2001;39(2):244-51.
86. Siperstein MD. Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J Lipid Res.* 1984;25(13):1462-8.
87. Solt D; Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature.* 1976; 263(5579):701-3.
88. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc.* 1976;35(6):1332-8.
89. Sukowati CH, Anfuso B, Torre G, Francalanci P, Croce LS, Tiribelli C. The expression of CD90/Thy-1 in hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study. *PLoS One.* 2013;8(10):e76830.
90. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol.* 2012;56(3):704-13.
91. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):768-80.
92. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(19):2300-8.
93. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010;52(5):1836-46.
94. Tsai YC, Leichner GS, Pearce MM, Wilson GL, Wojcikiewicz RJ, Roitelman J, et al. Differential regulation of HMG-CoA reductase and Insig-1 by enzymes of the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell.* 2012;23(23):4484-94.
95. Walenbergh SM, Koek GH, Bieghs V, Shiri-Sverdlov R. Non-alcoholic steatohepatitis: the role of oxidized low-density lipoproteins. *J Hepatol.* 2013;58(4):801-10.
96. Wree A, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(11):627-36.
97. Xiang S, Dong HH, Liang HF, He SQ, Zhang W, Li CH, et al. Oval cell response is attenuated by depletion of liver resident macrophages in the 2-AAF/partial hepatectomy rat. *PLoS One.* 2012;7(4):e35180.
98. Xu RH, Zheng LY, He DL, Meng J, Xia LP, Hao XB, et al. Profiling of differentially expressed microRNAs (miRNAs) during differentiation of rat hepatic oval cells (HOCs) into hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *Clin Transl Oncol.* 2015;17(3):230-7.
99. Yeganeh B, Wiechec E, Ande SR, Sharma P, Moghadam AR, Post M, et al. Targeting the mevalonate cascade as a new therapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease. *Pharmacol Ther.* 2014;143(1):87-110.
100. Yilmaz Y, Colak Y, Kurt R, Senates E, Eren F. Linking nonalcoholic fatty liver disease to hepatocellular carcinoma: from bedside to bench and back. *Tumori.* 2013;99(1):10-6.
101. Zheng T, Wang J, Jiang H, Liu L. Hippo signaling in oval cells and hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* 2011;302(2):91-9.
102. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, et al. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* 2006;79(11):1100-7.

Anexo I

Anexo I: Imagens macroscópicas representativas de fígado do grupo RH, NAFLD e BI de animais submetidos ao experimento de iniciação (A, B e C) e de seleção/promoção (D, E e F) da hepatocarcinogênese.

Anexo II

Anexo II: A-C) Imagens representativas de focos de hepatócitos alterados (FHA) com células claras, eosinofílicas e basofílicas, respectivamente; D-F) Áreas hepáticas com proliferação de células ovais.

Anexo III

Anexo III: A-C) Imagens representativas de esteatose predominantemente de padrão microgoticular (seta indica hepatócito balonizante)

Anexo IV

Anexo IV: Imagens representativas de LPN persistente e LPN em remodelação, respectivamente.