UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

**POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO DE LIPÍDIOS
ESTRUTURADOS OBTIDOS POR INTERESTERIFICAÇÃO DA
TRIBUTIRINA COM O ÓLEO DE LINHAÇA NA
HEPATOCARCINOGENESE**

Renato Heidor

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

São Paulo

2015

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

**POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO DE LIPÍDIOS
ESTRUTURADOS OBTIDOS POR INTERESTERIFICAÇÃO DA
TRIBUTIRINA COM O ÓLEO DE LINHAÇA NA
HEPATOCARCINOGENESE**

Renato Heidor

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientador Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo

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

Heidor, Renato
H465p Potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados obtidos
por interesterificação da tributirina com o óleo de linhaça na
hepatocarcinogênese / Renato Heidor. - São Paulo, 2015.
102p.

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

Orientador : Moreno, Fernando Salvador

1. Alimentos funcionais : Ciência dos alimentos 2. Carcinoma
hepatocelular I. T. II. Moreno, Fernando Salvador, orientador.

641.1

CDD

Renato Heidor

Potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados obtidos por
interesterificação da tributirina com o óleo de linhaça na
hepatocarcinogênese

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Tit.Fernando Salvador Moreno

orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo,_____ **de**_____

DEDICO ESTA TESE

A Dalmara, amada e compreensiva esposa que sempre esteve ao meu lado, mesmo quando optei em seguir o caminho difícil da vida acadêmica. Sem seu apoio, esta tese não seria possível.

*Amor é dado de graça,
é semeado no vento,
na cachoeira, no eclipse.
Amor foge a dicionários
e a regulamentos vários.*

Carlos Drumond de Andrade

Ao Felipe e Rafael, queridos filhos que me esperavam acordados nas diversas vezes que chegava tarde em casa. Lamento alguns momentos que estive ausente. A inocência e alegria deles me faz rejuvenescer e me motiva a sempre seguir em frente.

Aos meus pais Uradir e Dina, que mostraram que o único caminho possível é o conhecimento.

AGRADEÇO

Ao Professor Fernando Salvador Moreno, meu orientador, não só para esta tese, como também para minha vida. Durante a minha graduação tive o privilégio de trabalhar em seu laboratório. Lembro-me da primeira aula que assisti do Prof. Fernando a respeito de quimioprevenção do câncer. Tema fascinante! Lembro-me das aulas de vitaminas e lipídios na graduação. Aulas sensacionais! Agradeço todas as oportunidades fornecidas. De trabalhar e continuar trabalhando com quimioprevenção do câncer, de ter a honra de substituí-lo eventualmente em alguma aula ou palestra e de ter a oportunidade de poder aprender a escrever capítulos de livros e papers. Com ele continuo a aprender não somente como ser um pesquisador, mas também funciona nossa USP que, graças a Professores como o Fernando, é a referência de excelência no Brasil e uma das melhores com mundo.

Ao Professor Luiz Antonio Gioielli que sem a sua colaboração esse trabalho não seria possível. Agradeço a sua paciência em explicar as reações de interesterificação e gostaria muito de continuar mantendo essa parceria.

Ao Paulo Eduardo (“Chuka”), pela ajuda no difícil período do biotério. Tive a oportunidade de ensinar, aprender e acompanhar o seu crescimento. Por isso sou muito grato a ele.

A Kelly Furtado, que me ajudou na complicada leitura dos cortes histológicos e nas análises estatísticas. Sempre paciente, está disposta a ajudar a todos. Espero que continue por muito tempo no nosso laboratório.

A Juliana Ortega, que aceitou o desafio de fazer pesquisa científica, mesmo que não fosse com as “bolinhas de gordura”. Acompanhei o seu amadurecimento e aprendi muito com ela. Agradeço a oportunidade de trabalharmos juntos.

A Lurdinha, por não ter desistido de manter a ordem do nosso laboratório e pelos seus deliciosos cafés.

A Aline de Conti, por ter colaborado com esse trabalho desde início e compartilhado a sua experiência com biologia molecular adquirida no exterior.

A Roberta Claro que pacientemente me orientou a obter os lipídios estruturados. A oportunidade de trabalhar, mesmo por um curto período de tempo, em seu laboratório, foi enriquecedora.

Ao Professor Sergio Alberto Rupp de Paiva por ter colaborado com esse trabalho e ter apresentado boas ideias que acabaram resultando em uma importante publicação.

Ao Professor Venâncio Avancini Ferreira Alves, por ter participado do meu exame de qualificação e também por ter sido responsável pela sensacional disciplina “Patologia Hepática”, que me motivou a continuar estudando esse fascinante tema.

Aos colegas do laboratório: Mayara, Laura, Ernesto, Camile, Roberto e Aline Henriques, pela convivência e oportunidade de aprender com eles.

Aos antigos colegas do laboratório: Alessandra, Mônica, Clarissa, Aderuza, Fábila, Bruna, Giuliana, Joice, Renata, Bianca, Rogério, Roseli, Elaine, Cida, Luciana e Margareth, por ter me ajudado a cada vez mais a gostar de pesquisa.

Ao Prof Thomas Prates Ong pela amizade, convivência e colaboração.

Ao Carlos Eduardo Andrade Chagas (*in memoriam*) pela amizade e convivência.

A Deus, que sem Ele, nada seria possível.

RESUMO

Heidor, R. Potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados obtidos por interesterificação da tributirina com o óleo de linhaça na hepatocarcinogênese. 2015. 102f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O carcinoma hepatocelular (HCC) apresenta mau prognóstico o que torna importante sua quimioprevenção. Nesse sentido, a tributirina (TB), um inibidor de desacetilases de histonas (HDACi), mostrou-se um quimiopreventivo promissor da hepatocarcinogênese. Avaliaram-se aqui efeitos quimiopreventivos de lipídios estruturados (EST) obtidos por interesterificação enzimática a partir da TB com o óleo de linhaça (LIN). Ratos foram tratados com EST (grupo EST; 165 mg/100g peso corpóreo [p.c]), TB (grupo TB; 200 mg/100g p.c), LIN (grupo LIN; 133 mg/100g p.c), mistura de TB com LIN (grupo LIN; 165 mg/100g p.c) ou maltodextrina (MD) (grupo MD; controle isocalórico; 300 mg/100g p.c) diariamente durante 8 semanas consecutivas por gavagem. Duas semanas após início dos tratamentos, os animais foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” (RH). Os grupos EST e TB apresentaram atividade quimiopreventiva bloqueadora e supressora, respectivamente, da hepatocarcinogênese. TB induziu a apoptose, ao contrário dos EST. O tratamento com TB resultou na acetilação e trimetilação da H3K9 e H3K27, enquanto EST atuaram somente na trimetilação das mesmas. Quando analisada a expressão de genes envolvidos com modificações em histonas, EST e TB reduziram a expressão de Ezh2 e de Hdac4. Por outro lado, somente os EST aumentaram a expressão de Hdac6. Tal efeito por parte dos EST merece ser mais investigado, uma vez que esta desacetilase vem sendo sugerida como alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos. Em conclusão, a atividade quimiopreventiva de EST e da TB envolve na hepatocarcinogênese experimental mecanismos epigenéticos que podem ou não ser distintos.

Palavras Chave: hepatocarcinogênese, quimioprevenção, lipídios estruturados, tributirina, óleo de linhaça, epigenética.

ABSTRACT

Heidor, R. Chemopreventive potential of structured lipids obtained by interesterification of tributyrin with flaxseed oil in hepatocarcinogenesis. 2015. 102f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Hepatocellular carcinoma (HCC) has a poor prognosis, which makes its chemoprevention important. Tributyrin (TB), which is a histone deacetylase inhibitor (HDACi), is a promising chemopreventive agent of hepatocarcinogenesis. The chemopreventive effects of structured lipids (STLs) that were obtained by the enzymatic interesterification of TB with flaxseed oil (FSO) were evaluated in the present study. Rats were treated with STLs (STL group, 165 mg/100 g body weight (bw)), TB (TB group, 200 mg/100 g bw), FSO (FSO group, 133 mg/100 g bw), TB mixed with FSO (BLD group, 165 mg/100g bw) or maltodextrin (MD) (MD group; isocaloric control; 300 mg/100 g bw) daily for eight consecutive weeks by gavage. Two weeks after the initiation of treatment, the animals were subjected to the resistant hepatocyte hepatocarcinogenesis model (RH). The STL and TB groups developed blocker and suppressive chemopreventive activity against hepatocarcinogenesis, respectively. TB treatment induced apoptosis, unlike the STL treatment. Additionally, TB treatment resulted in the acetylation and trimethylation of H3K9 and H3K27, whereas the STLs acted only in the trimethylation of these histones. When analyzing the expression of genes involved in histone modifications, the STLs and TB reduced enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2) and histone deacetylase 4 (Hdac4) gene expression. Conversely, only the STLs increased Hdac6 gene expression. This effect of the STLs warrants further investigation because this deacetylase has been suggested as a potential drug development target. In conclusion, the chemopreventive activities of the STLs and TB in experimental hepatocarcinogenesis involve epigenetic mechanisms that may be distinct.

Keywords: hepatocarcinogenesis, chemoprevention, structured lipids, tributyrin, flax seed oil, epigenetics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 BREVE REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 <i>Carcinoma hepatocelular</i>	18
2.2 <i>Hepatocarcinogênese: eventos genéticos</i>	25
2.3 <i>Hepatocarcinogênese: eventos epigenéticos</i>	29
2.4 <i>Hepatocarcinogênese: modelo experimental do “hepatócito resistente”</i>	33
2.5 <i>A relação alimentação e câncer</i>	34
2.6 <i>Quimioprevenção do câncer</i>	36
2.7 <i>Ácido butírico e tributirina</i>	37
2.8 <i>Lipídios Estruturados</i>	39
3 OBJETIVO	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 <i>Preparo dos lipídios estruturados</i>	44
4.2 <i>Composição de ácidos graxos</i>	45
4.3 <i>Composição de triacilgliceróis</i>	46
4.4 <i>Regioespecificidade dos ácidos graxos</i>	47
4.5 <i>Calorimetria de fusão e cristalização</i>	47
4.6 <i>Animais</i>	48
4.7 <i>Doses dos lipídios estruturados e dos seus controles</i>	48
4.8 <i>Modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” (RH)</i>	49
4.9 <i>Protocolo Experimental</i>	50
4.10 <i>Eutanásia dos animais</i>	52
4.11 <i>Exame macroscópico do fígado</i>	52
4.12 <i>Dupla marcação imunoistoquímica para GST-P e BrdU</i>	52
4.13 <i>Avaliação da apoptose</i>	53
4.14 <i>Quantificação hepática de AB e AAL</i>	54
4.15 <i>Western blot para modificações em histonas</i>	55
4.16 <i>Análise da expressão do RASSF1A, NORE1A, CAV-1 e dos genes envolvidos nas modificações em histonas por RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction)</i>	57
4.17 <i>Análise estatística</i>	58
5 RESULTADOS	59
5.1 <i>Produção de lipídios estruturados</i>	59

<i>5.2 Consumo de ração, pesos corpóreo e hepático e análise macroscópica do fígado</i>	65
<i>5.3 Morfometria de LPN positivas para GST-P</i>	67
<i>5.4 Proliferação celular e apoptose</i>	68
<i>5.5 Quantificação hepática de AB e AAL</i>	71
<i>5.6 Modificações em histonas</i>	72
<i>5.7 Expressão gênica</i>	75
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO	86
8 REFERENCIAS	87
APENDICE	102

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Esquema representativo da produção de lipídios estruturados.</i>	41
<i>Figura 2: Esquema experimental para a produção dos lipídios estruturados.</i>	44
<i>Figura 3: Esquema do tratamento de ratos durante o modelo do “hepatócito resistente”.</i> ...	51
<i>Figura 4: Cromatogramas representativos da composição em triacilgliceróis.</i>	61
<i>Figura 5: Distribuição regiospecífica do grau de saturação de ácidos graxos.</i>	63
<i>Figura 6: Curvas de temperatura de fusão</i>	64
<i>Figura 7: Concentrações hepáticas de ácido alfa linolênico e ácido butírico</i>	72
<i>Figura 8: Padrão de acetilação e trimetilação da H3K9 e H3K27</i>	74
<i>Apêndice: Esquema experimental para a produção dos lipídios estruturados, aspecto macroscópico do fígado de ratos submetido ao modelo do RH, lesão pré-neoplásica persistente e lesão pré-neoplásica em remodelação.</i>	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de ácidos graxos obtidos por cromatografia a gás..... 60

Tabela 2: Distribuição regioespecífica do grau de saturação dos ácidos graxos 62

Tabela 3: Consumo de ração, peso corpóreo final e ganho de peso, bem como peso hepático relativo, incidência total de nódulos e número médio destes dos animais submetidos ao modelo do RH..... 66

Tabela 4: Análise morfométrica pela marcação com GST-P..... 68

Tabela 5: Análise quantitativa de núcleos de hepatócitos positivos para BrdU ou de corpúsculos por mm² em pLPN, rLPN ou no tecido ao redor das lesões (surrounding), assim como a relação entre proliferação celular e apoptose em animais submetidos ao modelo do RH 70

Tabela 6: Expressão gênica no fígado dos ratos submetidos ao modelo do “ hepatócito resistente”..... 77

ABREVIATURAS

AAL: ácido alfa linolênico

AB: ácido butírico

ADH: álcool desidrogenase

CAV-1: caveolina-1

CBAs: compostos bioativos dos alimentos

EMT: transição epitélio mesenquimal

EROs: espécies reativas de oxigênio

EST: lipídios estruturados

HBV: vírus da hepatite B

HCC: carcinoma hepatocelular

HCV: vírus da hepatite C

LIN: óleo de linhaça

LPN: lesões pré-neoplásicas

MIS: mistura de óleo de linhaça com tributirina

NAFLD: doença hepática gordurosa não alcohólica

NASH: esteato-hepatite não alcohólica

pLPN: lesões pré-neoplásicas persistentes

RH: hepatócito resistente

rLPN: lesões pré-neoplásicas em remodelação

TB: tributirina

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular é o quinto câncer mais incidente no mundo (LI et al., 2014). Este é frequentemente diagnosticado em fases avançadas, limitando abordagens terapêuticas (FOMER et al., 2014). Tornam-se, portanto, importantes medidas de controle dessa neoplasia, como a quimioprevenção. Modelos de hepatocarcinogênese química são amplamente utilizados para seu estudo, como o modelo clássico do “hepatócito resistente” (FARBER, SARMA, 1987; ANDERSEN et al., 2010; PERRA et al., 2014). Este, além de reproduzir com grande similaridade a hepatocarcinogênese tal como observada em seres humanos, possibilita a sincronização das diversas etapas do processo, o que facilita não só sua identificação como também a condução de estudos de quimioprevenção (PERRA et al., 2014; PETRELLI et al., 2014).

Diversos compostos naturais ou sintéticos podem suprimir ou bloquear as etapas da hepatocarcinogênese, atuando como quimiopreventivos (DARVESH, BISHAYEE, 2013; SINGH et al., 2014). Com o advento da biotecnologia, é possível combinar características de ácidos graxos em uma mesma molécula de triacilglicerol por meio de modificação lipídica, com possíveis aplicações no desenvolvimento de alimentos funcionais ou de fármacos para o controle de doenças (FARFÁN et al., 2013), como a quimioprevenção do câncer. Uma das modificações lipídicas mais importantes é a produção de lipídios estruturados, que são triacilgliceróis modificados na composição e/ou distribuição de ácidos graxos no esqueleto de glicerol. Lipídios estruturados podem ser obtidos por síntese química ou enzimática. Esta última tem a vantagem de proporcionar maior controle na distribuição posicional dos ácidos graxos na molécula

de glicerol, já que lipases podem realizar hidrólise de ligações éster nas posições *sn-1,3*, sem modificar a *sn-2* (IWASAKI, YAMANE, 2010).

O ácido alfa-linolênico (C18:3n-3), após sua digestão e absorção pode ser convertido em outros metabólicos que atuam na prevenção de processos inflamatórios, doenças cardiovasculares, artrite e câncer (RAJARAM, 2014; KIM et al., 2014). Dentre fontes importantes de ácido alfa-linolênico, destaca-se o óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*), que apresenta ácidos graxos insaturados predominantemente na posição *sn-2* e tem sido considerado um dos substratos ideais para a obtenção dos lipídios estruturados (KHODADADI et al., 2014). Porém, a literatura é escassa em estudos que envolvem a obtenção e os mecanismos dos lipídios estruturados envolvidos no contexto da quimioprevenção do câncer, especialmente do carcinoma hepatocelular.

Uma molécula promissora no contexto da quimioprevenção do câncer é o ácido butírico, que apresenta *in vitro* (HUANG, PLASS, GERHAUSER, 2011) atividade inibitória da enzima desacetilase de histonas. Entretanto, sua utilização *in vivo* é limitada devido a sua meia-vida curta e dificuldade de serem alcançadas concentrações plasmáticas efetivas. Nesse sentido, uma alternativa com propriedades farmacocinéticas favoráveis é a tributirina, triacilglicerol pró-fármaco do ácido butírico. A tributirina apresentou atividade inibitória da proliferação e indutora da diferenciação celular, além de consistir em potente agente pró-apoptótico *in vitro* em diferentes culturas de células (HEIDOR et al., 2012). Além disso, a tributirina também atuou como inibidor da enzima desacetilase de histonas quando administrada a ratos submetidos a modelo de carcinogênese de cólon (HEIDOR et al., 2014) bem como de hepatocarcinogênese (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2013; GUARIENTO et al., 2014).

Dados da literatura fornecem evidências de que o carcinoma hepatocelular é uma condição patológica onde alterações genéticas e epigenéticas exercem papel importante em seu desenvolvimento (POGRIBNY, RUSYN, BELAND, 2008; CHAPPELL et al., 2014). Enquanto modificações genéticas na hepatocarcinogênese estão sendo extensivamente estudadas, a contribuição das alterações epigenéticas no HCC ainda permanecem pouco exploradas (POGRIBNY, RUSYN, BELAND, 2008). Assim, visou-se no presente estudo obter lipídios estruturados a partir de uma mistura da tributirina com o óleo de linhaça e avaliar seu potencial quimiopreventivo no modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”, além de explorar o papel destes triacilgliceróis na modulação de genes envolvidos com modificações epigenéticas em histonas.

2 BREVE REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Carcinoma hepatocelular*

O carcinoma hepatocelular (HCC), que responde por cerca de 90% das neoplasias primárias de fígado, é o quinto câncer mais incidente e o terceiro em mortalidade no mundo (LAFARO et al., 2015). O prognóstico dessa neoplasia é ruim, com relação mortalidade/incidência de 0,95 (FERLAY et al., 2010). O HCC ocorre geralmente em um *background* de doença hepática crônica, sendo a principal causa de morte em pacientes com cirrose (FORNER, LLOVET, BRUIX, 2012). Mais de 80% dos casos de HCC ocorrem na Ásia Oriental e na África Subsaariana, enquanto a incidência na Europa, América do Norte e do Sul é relativamente baixa (LAFARO et al., 2015).

Mais da metade dos casos das neoplasias hepáticas no mundo ocorrem na China. Em outros países da Ásia Oriental a incidência também é elevada (FERLAY et al., 2015). Os casos de HCC nesses países podem estar relacionados com a elevada taxa de infecção com o vírus da hepatite B (HBV) (LAFARO et al., 2015). O Japão também apresenta elevada incidência de HCC, porém, diferente de outros países da Ásia Continental, os casos da doença podem estar relacionados com infecções com o vírus da hepatite C (HCV). A incidência do genótipo 1 b do HCV está aumentando entre os japoneses, sendo responsável por 73% dos casos de infecção pela hepatite C. Como esse genótipo apresenta menor sensibilidade à terapia antiviral quando comparado ao 1 a, comum nos Estados Unidos e Europa, a incidência do HCC que está relacionado com a infecção pelo HCV no Japão é o dobro da constatada em países Ocidentais

(PELLICELLI et al., 2012). Na África Subsaariana, apesar da doença ser subnotificada, principalmente em áreas rurais, acredita-se que a incidência do HCC seja elevada (FERLAY et al., 2010) e que a infecção crônica pelo HBV seja o principal fator etiológico (LADEP et al., 2014). Apesar dos Estados Unidos e Europa apresentarem menor incidência do HCC quando comparados aos países da Ásia Oriental e África Subsaariana, o número de pacientes diagnosticados com câncer de fígado triplicou de 1975 a 2005 (FERLAY 2015). Esse aumento está relacionado, principalmente, com infecções do HCV, ocorridas durante as décadas de 1960 e 1980. Levando-se em conta o período entre a contaminação com o HCV e o desenvolvimento do HCC, que pode variar de 20 a 40 anos, o pico dos casos de neoplasias hepáticas nos Estados Unidos ocorrerá na década de 2020 (ALTEKRUSE et al., 2009). A incidência do HCC na Europa, principalmente em países Mediterrâneos, como Espanha e Itália, é semelhante à observada nos Estados Unidos e também está relacionada à infecção com o HCV (FERLAY et al., 2010). Apesar de apresentar reduzida incidência de neoplasias hepáticas, quando comparado com outros países, 65,3% dos casos de HCC no Brasil estão relacionados com infecções por HCV (PARANAGUÁ-VEZOZZO et al., 2014). Assim, as infecções por HBV e HCV constituem, atualmente, nos principais agentes etiológicos do HCC no mundo (ARZUMANYAN, REIS, FEITELSON, 2013; TRÉPO, CHAN, LOK, 2014; WEBSTER, KLENERMAN, DUSHEIKO, 2015).

O ambiente inflamatório e regenerativo é característico na hepatocarcinogênese relacionada com as infecções pelo HBV e HCV (REHERMANN, NASCIMBENI, 2005). Apesar de células do sistema imunológico como linfócitos, NK (do inglês *natural killer*), leucócitos polinucleares e NKT (do inglês *natural killer T*) estarem presentes no processo inflamatório hepático, elas não são suficientes para depuração do

vírus, uma vez que os genomas do HBV e do HCV codificam proteínas que suprimem a resposta imunológica (ARZUMANYAN, REIS, FEITELSON, 2013). Alterações na produção de citocinas também estão relacionadas com a eliminação reduzida dos vírus. Na infecção crônica por HBV há deficiência na produção de interferon e a sua terapia de reposição apresenta atividade antiviral, como observado em camundongos HBV transgênicos. Porém o tratamento com interferon reduz a carga viral somente em alguns pacientes infectados com HBV (TRÉPO, CHAN, LOK, 2014) ou HCV (WEBSTER, KLENERMAN, DUSHEIKO, 2015).

Os genomas do HBV e do HCV codificam proteínas que modificam a expressão gênica das células hospedeiras. O genoma do HBV codifica para a proteína hepatitis Bx (HBx) e provavelmente, para carboxi-poli-peptídeos com terminações em serina (S) ou pré – S truncadas, contribuindo, dessa forma, para a hepatocarcinogênese. No mesmo sentido, o HCV codifica proteína *core* e proteínas não estruturais NS3 e NS5A. Mudanças na expressão gênica nas células infectadas que promovem a hepatocarcinogênese também parecem favorecer a replicação viral ou ainda proteger o HBV e o HCV contra a resposta imunológica (ARZUMANYAN, REIS, FEITELSON, 2013). A regeneração de hepatócitos durante a doença hepática crônica resulta, frequentemente na integração da HBx e provavelmente, também, de poli-peptídeos com terminações em S ou pré – S em sequências do DNA da célula hospedeira. Embora esse processo ocorra de forma a modificar a expressão gênica de genes adjacentes ou próximos aos sítios de integração (mecanismo de atuação cis), acredita-se que não seja esse o principal mecanismo da hepatocarcinogênese pelo HBV. Como a integração da HBx e dos poli-peptídeos com terminações em S ou pré-S ocorrem em diferentes sítios do DNA hospedeiro, supõe-se que esse processo leve à síntese de proteínas que alterem

a expressão de genes em diversos *loci* cromossômicos da célula infectada (mecanismo de atuação trans). A infecção pelo HCV não envolve a integração do seu genoma com o DNA da célula hospedeira. Assim, a síntese de proteínas ocorre por um epissoma associado ao retículo endoplasmático (ARZUMANYAN, REIS, FEITELSON, 2013). As alterações na expressão gênica nas células infectadas pelo HBV e HCV ocorrem em ambiente modulado pelo sistema imunológico e podem promover a cirrose hepática e o HCC (LIN et al., 2014).

Outro importante fator etiológico do HCC é o consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas. Esses compostos foram isolados e caracterizados no início da década de 1960. Nessa época, amendoins contaminados por fungos foram utilizados para a produção de uma ração que ocasionou a morte de 100.000 perús (BENNETT, KLICH, 2003). A investigação demonstrou que a causa das mortes das aves foi micotoxinas produzidas pelos *Aspergillus flavus* e pelo *Aspergillus parasiticus*, denominadas aflatoxinas (DELONGH et al., 1962). Dentre estas, destacam-se as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 que são reconhecidas como carcinógenas para humanos, sendo a aflatoxina B1 (AFB1) um dos mais potentes agentes hepatocarcinogênicos conhecidos (BENNETT, KLICH 2003; HAMID et al., 2013). AFB1 é comum no sudoeste asiático e África subsaariana, onde a elevada temperatura e umidade favorecem a proliferação dos *Aspergillus sp.* Convém ressaltar ainda que essas regiões abrigam países com baixo índice de desenvolvimento e que não apresentam medidas adequadas de controle sanitário. Além dos amendoins, AFB1 pode ser encontrada no arroz, milho e pistaches (GROSS-STEINMEYER, EATON, 2012).

AFB1 é metabolizada pelas enzimas do citocromo P450, principalmente pelas CYP1A e CYP3A4 em intermediários reativos como oxido-8,9 aflatoxina B1 (AFBO) e

outros metabólitos como a aflatoxina M1 (AFM1) e aflatoxina Q1 (AFQ1) que são hidroxiladas, assim como aflatoxina P1 (AFP1) que é desmetilada. Os compostos AFM1, AFQ1 e AFP1 apresentam reduzida toxicidade quando comparados à AFB1. Por sua vez, AFBO, por ser uma molécula altamente reativa, pode ligar-se ao DNA, produzindo adutos, como o 8,9-dihidro-8-(N7guanil)-9-hidroxi-AFB1 (AFB1 N7-Gua). Se o dano não for reparado, o aduto apresenta potencial de formar alterações somáticas se estiver localizado em regiões do DNA com transcrição ativa e dessa forma, levar à hepatocarcinogênese (GROSS-STEINMEYER, EATON, 2012; HAMID et al., 2013).

O consumo de bebidas alcóolicas também parece estar relacionado com a hepatocarcinogênese conforme demonstrado em diversos estudos (MORGAN, MANDAYAM, JAMAL, 2004; THYGESEN et al., 2008; THYGESEN et al., 2009). O aumento da incidência de HCC está provavelmente associado com a maior probabilidade de desenvolvimento de cirrose hepática, que é caracterizada como lesão pré-neoplásica, em indivíduos que ingerem diariamente 80g ou mais de etanol, equivalentes, aproximadamente a 1L de vinho ou a 2,5L de cerveja (THYGESEN et al., 2009). O consumo crônico de bebidas alcóolicas também aumenta o risco de desenvolvimento de cirrose hepática em indivíduos infectados por HBV ou HCV (SEITZ, STICKEL, 2007).

Os produtos do metabolismo do etanol parecem estar envolvidos com a hepatocarcinogênese. Este metabolismo pode ocorrer por três principais vias: a catalisada pela enzima álcool desidrogenase (ADH), a da CYP2E1 do citocromo P450 e da catalase (McKILLOP, SCHRUM, 2005). Embora o produto principal desse metabolismo seja o acetaldeído, um reconhecido agente carcinogênico em animais

(BOFFETTA, HASHIBE, 2006), as concentrações hepáticas desse composto são reduzidas, sugerindo a presença de um sistema de metabolização eficiente.

O metabolismo do etanol pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio. Essas espécies são produtos, principalmente, da atividade da ADH e da CYP2E1 do citocromo P450, além do complexo enzimático IV da cadeia respiratória (WU et al., 2003). As enzimas ADH e CYP2E1 produzem EROs como produto secundário da conversão do etanol em acetaldeído. No caso da ADH, há a produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). A conversão do acetaldeído pela enzima aldeído desidrogenase em acetato também produz NADH. Assim, o aumento na produção de moléculas de NADH aumenta a atividade das enzimas da cadeia respiratória, principalmente as do complexo IV, levando ao aumento, também, da produção de EROs (WU et al., 2003). Por sua vez, o consumo crônico de bebidas alcóolicas aumenta de 10 a 20 vezes a expressão hepática da CYP2E1 (SEITZ, STICKEL, 2007), com consequente aumento na produção de EROs. Além disso, a exposição crônica ao etanol induz a depleção da glutatona, tornando os hepatócitos mais sensíveis aos efeitos dos EROs (LOUVET, MATHURIN, 2015).

As espécies reativas de oxigênio podem gerar produtos de peroxidação como propanodial (malondialdeído, MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE). O 4-HNE reage com a deoxiadenosina e deoxicitidina formando adutos de DNA 1,N⁶-etenodeoxiadenosina e 3,N⁴-etenodeoxicitidina, respectivamente (el GHISSASSI, et al., 1995). Estes adutos podem ocasionar mutações no códon 249 da *TP53* que codifica a p53, tornando o hepatócito resistente à apoptose (SEITZ, STICKEL, 2007). Espécies reativas de oxigênio também podem reagir com etanol e átomos de ferro, produzindo radicais

hidroxil, hidroxietil e também óxido ferroso. Esses metabólitos são responsáveis pela peroxidação lipídica de membranas celulares (LOUVET, MATHURIN 2015).

O aumento do estresse oxidativo no retículo endoplasmático de hepatócitos devido ação das EROs contribui para a inflamação (PETRASEK et al., 2013). Nas células estreladas, ocorre a inibição da autofagia e a diferenciação em células fibrogênicas (HERNANDEZ-GEA et al., 2013). Outra consequência do estresse oxidativo é a ativação de vias esteatogênicas, como a da SREBPs (do inglês *sterol regulatory element-binding proteins*) (LOUVET, MATHURIN, 2015).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD, do inglês *nonalcoholic fatty liver disease*) é a afecção no fígado mais comum em indivíduos que vivem em países desenvolvidos. NAFLD abrange um grande espectro de condições patológicas, desde a esteatose hepática até mesmo esteato-hepatite não alcoólica (NASH, do inglês *nonalcoholic steatohepatitis*). Esta é a forma mais agressiva de NAFLD e pode progredir para cirrose hepática e HCC (STARLEY, CALCAGNO, HARRISON, 2010; NOUREDDIN, RINELLA, 2015). Também contribuem para essa condição patológica o diabetes e a obesidade (GEORGE et al., 1998).

No caso da NAFLD e da NASH, a resistência à insulina associada à diabetes e à obesidade aumentam a disponibilidade de ácidos graxos livres (FFA, do inglês *free fatty acids*) que estão envolvidos com a mobilização de diversas moléculas pró-inflamatórias. Evidências sugerem que essas moléculas ativam vias moleculares relacionadas com a morte celular e proliferação compensatória de hepatócitos. Nesse mesmo sentido, o aumento nas concentrações de insulina está relacionado com a proliferação celular, inibição da apoptose e a ativação de vias de sinalização de citocinas que apresentam expressão aumentada no HCC. Além disso, o desenvolvimento do HCC no ambiente

modulado pela NASH também envolve EROs como observada na hepatocarcinogênese relacionada com o etanol (STARLEY, CALCAGNO, HARRISON, 2010).

O HCC é frequentemente diagnosticado em fases avançadas, limitando as abordagens terapêuticas como a ressecção cirúrgica, transplante hepático ou ablação percutânea. Cerca de 70% dos pacientes que foram submetidos a essas terapias apresentam recorrência da doença em até 5 anos, que frequentemente atinge estágio mais agressivo do que a neoplasia primária (LLOVET, BRUIX, 2008; BRUIX et al., 2012). A abordagem farmacológica comum é com o inibidor multiquinase sorafenibe (4 - [4 - ([4 - cloro - 3 - (trifluorometil)fenil]carbamoil}amino)fenoxi] - N - 2 - metilpiridina - 2 - carboxamida; Nexavar®) que aumenta a sobrevida dos pacientes com HCC de 7,9 para 10,7 meses, em média (LLOVET et al., 2015).

2.2 Hepatocarcinogênese: eventos genéticos

A hepatocarcinogênese é um processo que se desenvolve em múltiplas etapas envolvendo o acúmulo de alterações somáticas que combinam mutações em genes *drivers* e em *passengers* (SAWAN et al., 2008; VOGELSTEIN et al., 2013). Mutações em genes *drivers* estão relacionadas com a carcinogênese. Por outro lado, as mutações em genes *passengers* ocorrem durante o desenvolvimento da pré-neoplasia e não constituem em vantagens adicionais para a carcinogênese (VOGELSTEIN et al., 2013).

Técnicas de sequenciamento do DNA de nova geração demonstraram que o HCC apresenta de 30 a 40 mutações, aonde de 6 a 8 podem ser em genes *drivers*. Os potenciais *drivers* que apresentam mutações no HCC compreendem genes envolvidos com a estabilidade dos telômeros, controle do ciclo celular, remodelação da cromatina,

estresse oxidativo e vias de sinalização da β -catenina/Wnt, Ras/PI3K/MTOR, JAK/STAT, PDGF e IGF (IGFR2). Amplificações e deleções foram também observadas em genes relacionados com o controle do ciclo celular (TORRECILLA, LLOVET, 2015).

Estudos demonstraram que não foram identificadas diferenças significativas na frequência das mutações nos HCC de diferentes etiologias (GUICHARD et al., 2012; NAULT, 2014). Assim, por exemplo, a inativação ou mutação do *p53* parece ser um evento presente na hepatocarcinogênese modulada pelo HBV, HCV e AFB1. No mesmo sentido, a ativação de vias moleculares relacionadas com a inflamação e estresse oxidativo estão presentes na hepatocarcinogênese induzida pelo HBV, HCV, etanol e NASH (FARRELL et al., 2009).

Durante a iniciação da hepatocarcinogênese, uma única ou uma pequena subpopulação de células hepáticas adquirem potencial proliferativo ilimitado, de acordo com o modelo denominado estocástico ou de evolução clonal (MERLO et al., 2006). Porém, outra hipótese sugere que uma pequena população de células quiescentes, que apresentam características de progenitoras, é responsável pela iniciação do desenvolvimento do HCC. Neste modelo hierárquico, denominado de CSC (do inglês *cancer stem cell*), poucas células presentes na neoplasia apresentam o potencial de diferenciação e a capacidade de recapitular a neoplasia original (MA et al., 2007). Alguns estudos demonstram que o HCC iniciado a partir de CSC apresenta pior prognóstico (ARAVALLI et al., 2013).

Alguns dos clones celulares iniciados são selecionados e proliferam durante o estágio de promoção da hepatocarcinogênese (CALVISI et al., 2004) originando uma pré-neoplasia. Esta é, geralmente, constituída por *foci* de hepatócitos com expressão

enzimática alterada e nódulos displásicos (KOJIRO, ROSKAMS, 2005). Agentes promotores estão envolvidos na proliferação e resistência à apoptose dos clones iniciados (COLUMBANO et al., 2005). Esses agentes podem ser fatores que induzem a citotoxicidade crônica, inflamação e estímulo regenerativo como ocorre, por exemplo, na hepatite alcoólica (LIEBER et al., 2004). Alguns agentes promotores inibem a mitose de hepatócitos não iniciados, e o estímulo regenerativo seleciona as células resistentes a esses compostos (FARBER, SARMA, 1987). Uma vez que a promoção é uma fase que apresenta como característica a reversibilidade, é necessária a exposição constante ao agente promotor para que a pré-neoplasia progrida (PITOT, 2001).

A fase de progressão da hepatocarcinogênese pode ser caracterizada pela ativação da transição epitélio-mesenquimal (EMT) (FUXE, KARLSSON, 2012; PICKUP, NOVITSKIY, MOSES, 2013). A conversão do fenótipo epitelial para o mesenquimal é um processo normal durante a embriogênese e é mediado por um espectro de fatores. Porém, durante a hepatocarcinogênese, a EMT resulta em alterações na morfologia celular, expressão de proteínas mesenquimais e aumento da invasão tecidual (KAIMORI et al., 2010, De CRAENE, BERX, 2013). O aumento da expressão de TGF β 1 (do inglês *transforming growth factor β 1*), uma citocina pró-fibrogênica que atua inibindo a proliferação de hepatócitos, mas não das células ovas, parece estar envolvida na EMT durante a hepatocarcinogênese (ARAVALLI, CRESSMAN, STEER, 2013). A hipóxia pode também apresentar papel importante na progressão da hepatocarcinogênese, uma vez que está relacionada com o aumento da angiogênese e metástase (ARAVALLI, CRESSMAN, STEER, 2013). Assim como a EMT, a hipóxia pode ocorrer também em lesões pré-neoplásicas. Existem evidências de que a hipóxia induz a expressão gênica mediada pelo fator de transcrição HIF-1 α (do inglês *hypoxia*

induced factor-1 α), resultando no aumento da glicólise e também da EMT mediada pela via de sinalização PI3K/AKT (do inglês *Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B*) (MURATA et al., 2010).

Alguns estudos demonstraram que a ocorrência de LPN hepáticas está associada a um metabolismo anormal de ácidos graxos de cadeia longa, em especial os poli-insaturados, (HRELIA et al., 1994; ABEL et al., 2001). A alteração no perfil celular de ácidos graxos pode modificar vias de sinalização celular envolvidas com a proliferação e apoptose, além de alterar a composição das membranas celulares (ABEL et al., 2001). Estas apresentam microdomínios denominados *lipid rafts* e *caveolae* que são caracterizados pelo elevado grau de ordenação das cadeias acila saturadas. Estes microdomínios são constituídos, basicamente, por lipídios de membrana, colesterol e proteínas específicas, como a caveolina (SIMONS, VAZ, 2004).

A caveolina-1 (cav-1) é uma proteína reguladora de moléculas sinalizadoras (OKAMOTO et al., 1998) e vários estudos demonstram sua atividade antiproliferativa (ENGELMAN et al., 1997). Porém, seu papel na hepatocarcinogênese ainda não está bem definido. Em modelo de esteatose não alcoólica em ratos, observou-se aumento da expressão de cav-1 hepática, o que pode estar relacionado com alterações na lipogênese (MASTRODONATO et al., 2011). Em outro estudo verificou-se a hiper-expressão de cav-1 no fígado de pacientes cirróticos e também naqueles com HCC (COKAKLI et al., 2009). Porém, Hirasawa e colaboradores verificaram que CAV1 está silenciado em diversos tipos de câncer e é provável que possa apresentar atividades supressoras de tumor em neoplasias de pulmão e mama, além do HCC (HIRASAWA, et al., 2006).

O desenvolvimento de diversos tipos de cânceres pode estar relacionado com mutações pontuais que ativam oncogenes da família RAS, que são traduzidos em

proteínas que podem estar presentes em *lipid rafts* (CHONG, VIKIS, GUAN, 2003). Em seu estado ativo, RAS interagem com proteínas efetoras como as da família com associação ao domínio Ras (RASSF; do inglês *Ras-association domain family*), que são consideradas supressoras de tumor, ao contrário dos efetores tradicionais do RAS, como o RAF (do inglês *rapidly accelerated fibrosarcoma*) e PI3K (do inglês *Phosphatidylinositol 3-kinase*), que são oncoproteínas (van der WEYDEN; ADAMS, 2007).

2.3 Hepatocarcinogênese: eventos epigenéticos

O HCC desenvolve-se em um processo longo que envolve, além de alterações genéticas, a desregulação de eventos epigenéticos (POGRIBNY, RUSYN, BELAND, 2008). Estes são alterações na expressão gênica que podem ser hereditárias em nível celular, denominadas também como epimutações e que são independentes de mudanças da sequência de nucleotídeos do DNA (JIANG, BRESSLER, BEAUDET, 2004; PELTOMÄKI, 2012). Eventos epigenéticos que eventualmente podem estar desregulados durante a hepatocarcinogênese consistem na metilação do DNA, modificações em histonas e na expressão de miRNAs (do inglês *small non-coding microRNAs*).

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais estudada (SHUKLA, MEERAN, 2014). Ela é catalisada pela família de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) que adiciona grupo metila fornecido pela S-adenosil-metionina (SAM), no carbono 5 da citosina. Esta base nitrogenada está presente, principalmente, em regiões com sequências de dinucleotídeos constituídos por citosinas e guaninas denominada

ilhas CpG, que estão frequentemente associadas com sítios de início de transcrição gênica (BIRD, 1986). Uma condição comum em diversas neoplasias é a hipometilação genômica, ou seja, redução no número de citosinas metiladas, quando comparado ao tecido não neoplásico. Este evento pode ser resultado da disponibilidade reduzida de SAM, integridade genômica comprometida, como no caso de presença de lesões não reparadas no DNA ou, ainda, expressão ou atividade alterada de DNMTs, como a DNMT1, principal enzima responsável pela metilação do DNA (SUBRAMANIAM et al., 2014). A hipometilação genômica pode contribuir para com a carcinogênese por meio de diversos mecanismos, como a instabilidade cromossômica (EDEN et al., 2003), desmetilação de genes que apresentam um alelo silenciado (FEINBERG, CUI, OHLSSON, 2002), ativação de retrotransposons (SLOTKIN, FREELING, LISCH, 2007) e indução da expressão de oncogenes, como o *myc* (CALVISI et al., 2007).

Outro evento epigenético presente na carcinogênese que envolve a transferência de grupos metila é o silenciamento de genes específicos por hipermetilação. Este processo é caracterizado pela metilação de domínios no DNA que geralmente estão presentes em ilhas CpG, localizadas em diversas regiões do genoma, principalmente na porção 5' de promotores de genes. Esse evento favorece o recrutamento de proteínas MBDs (do inglês *methyl-CpG-binding domain*) para sítios do DNA hipermetilado. As MBDs, por sua vez, recrutam proteínas que formam complexos repressores da transcrição que são encontradas nas regiões promotoras de genes supressores de tumor em diversas neoplasias (SHUKLA, MEERAN, 2014), inclusive no HCC (POGRIBNY, RUSYN, 2014). Durante esse processo, além das MBDs, o domínio transcricional da DNMT1 também recruta proteínas como desacetilases de histonas (HDACs), além de outras que remodelam a cromatina, impedindo o acesso de fatores de transcrição ao

DNA (HAMIDI, SINGH, CHEN, 2015). Assim, mudanças no padrão de metilação do DNA não podem ser consideradas como eventos isolados. Estas estão presentes em um contexto em que ocorrem alterações no epigenoma, que incluem também modificações em histonas (POGRIBNY, RUSYN, 2014).

Estudos demonstraram que o HCC apresenta padrões de metilação diferentes quando comparado ao tecido normal adjacente (surrounding). Vários genes silenciados por hipermetilação de suas regiões promotoras foram identificados no HCC, como os supressores de tumor *RASSF1A*, *p16^{INK4a}*, *p15^{INK4b}*, *RB1*, *SOCS1*, *SOCS3*, *SYC*, *GSTP1*, *NQO1*, *PROX1*, *NORE1B*, *RIZ1*, *RELN*, *FBLN1* e *PAX5*. Alterações dos padrões de metilação na hepatocarcinogênese podem ser consideradas eventos precoces (POGRIBNY, RUSYN, 2014; MA et al., 2014).

Modificações em histonas incluem acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, biotinilização, sumolização e ADP-ribosilação (BÁRTOVÁ et al., 2008). No HCC, as mais estudadas são a acetilação e a metilação (POGRIBNY, RUSYN, 2014). A acetilação de histonas relaxa a cromatina que se encontra normalmente superespiralada. Esse processo permite o acesso de proteínas ligadoras do DNA e regulatórias da transcrição a regiões promotoras dos genes. A regulação do estado de acetilação das histonas ocorre pelas enzimas acetilases (HAT) que adicionam grupos acetila em resíduos de lisina ou arginina, e por desacetilases de histonas (HDAC) que removem o grupo acetila destes aminoácidos (DAVIE 2003). O HCC apresenta desregulação de diversas HDACs como HDAC1, HDAC2, HDAC3 e SIRT1. Por sua vez, a metilação de histonas ocorre também em resíduos de lisina ou arginina e pode ativar ou suprimir efetores da transcrição dependendo da quantidade de grupos metila

envolvidos. Metiltransferases de histonas (KMTs), como a SMYD3, RIZ1 e EZH2, catalisam a transferência de até 3 grupos metila da SAM para resíduos específicos de histonas, enquanto a remoção de grupos metila ocorre pela ação de desmetilases de histonas (KDMs) (SUPIC, JAGODIC, MAGIC, 2013).

O silenciamento de genes supressores de tumor durante a hepatocarcinogênese, além de estar associado com a metilação do DNA, também está relacionado com modificações de histonas nas regiões promotoras desses genes (POGRIBNY, RUSYN, 2014). Assim, o silenciamento do *RIZ1*, $p16^{\text{INKa}}$ e *RASSF1A* no HCC está relacionado com o aumento da expressão da histona H3 trimetilada nos resíduos de lisina 9 (H3K9me3) e 27 (H3K27me3) em suas regiões promotoras. Paralelamente, a hepatocarcinogênese apresenta como característica a redução da expressão da histona H4 trimetilada no resíduo de lisina 20 (H4K30me3) e aumento na expressão da histona H3 trimetilada no resíduo de lisina 27 (H3K27me3) (POGRIBNY, RUSYN, 2014).

Diversos estudos sugerem que miRNAs possam ser responsáveis por outro mecanismo de regulação epigenética da expressão gênica (WONG et al., 2013). miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificante constituídas por uma sequência de 16 a 29 nucleotídeos e que atuam como reguladores negativos de genes em nível pós transcricional e que podem se ligar em sequências complementares não traduzidas de mRNAs alvos e desta forma, regular a expressão de genes alvos (POGRIBNY, RUSYN, 2014). Mudanças na expressão de miRNAs estão relacionadas com diversas neoplasias (ROMERO-CORDOBA et al., 2014), inclusive o HCC (SHI et al., 2015), uma vez que foram identificados diversos miRNAs que potencialmente tem com alvos genes relacionados com a diferenciação e proliferação celular, além da apoptose (POGRIBNY, RUSYN, 2014). Nesse sentido, recentemente foi descrito que as

expressões de miR-221, miR-181b-1, miR-155-5p, miR-25 e miR-17-5p estavam reduzidas tanto no HCC produzido em camundongos como em neoplasias hepáticas humanas (MORISHITA, MASAKI, 2015).

2.4 Hepatocarcinogênese: modelo experimental do “hepatócito resistente”

A hepatocarcinogênese é um processo que ocorre em múltiplas etapas (FARBER, SARMA, 1987). A iniciação pode ser causada por carcinógenos genotóxicos que provocam danos no DNA. A falha na correção desses danos, seguida de proliferação celular, leva à formação inicial de focos de hepatócitos alterados fenotipicamente, conhecidos como lesões pré-neoplásicas (LPN). As LPN podem progredir para nódulos, adenomas e, por fim, para o câncer (FEO et al., 2006). A demonstração de que essas alterações estão sequencialmente associadas indica que os focos representam etapas pré-neoplásicas, que podem ser considerados marcadores histológicos da futura neoplasia hepática (FARBER, SARMA, 1987).

O modelo do “hepatócito resistente” (RH), descrito em 1976 (SOLT, FARBER, 1976) e modificado em 1987 por Semple-Roberts e colaboradores, é um dos protocolos experimentais mais utilizados no estudo da hepatocarcinogênese química, sendo adequado para induzir elevada incidência de neoplasias, bem como para se avaliar e comparar os efeitos de substâncias quimiopreventivas capazes de modular o processo carcinogênico (FARBER, SARMA 1987). O modelo baseia-se na hipótese de que o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) é capaz de inibir a proliferação da maioria dos hepatócitos normais, mas não a dos iniciados (resistentes). Nesse modelo, diferentes estágios da hepatocarcinogênese podem ser identificados, como a iniciação, promoção e progressão,

devido à sincronização da indução de focos e nódulos de hepatócitos, além de reproduzir com grande similaridade a hepatocarcinogênese tal como observada em seres humanos (FEO et al., 2006; ANDERSEN et al., 2010; PETRELLI et al., 2014).

Uma das características positivas do modelo do RH é sua propriedade de distinguir lesões pré-neoplásicas persistentes, consideradas sítios de progressão para o HCC, das que sofrem remodelação para um aspecto “normal” do fígado (RIZZI et al., 1997; ANDERSEN et al., 2010). Cerca de 95 a 98% das LPN produzidas no modelo do RH sofrem remodelação, enquanto que 2 a 5% têm características de LPN persistentes com tendência de evolução para o câncer (FARBER, SARMA, 1987).

2.5 A relação alimentação e câncer

No início da década de 1980 foi estimado que cerca de 35% de todas as mortes causadas pelo câncer nos EUA poderiam ser atribuídas ou até mesmo prevenidas pela alimentação. Aventou-se que a alimentação é um contribuinte tão importante para a carcinogênese quanto o uso de tabaco. Esta hipótese é suportada por propriedades biológicas dos nutrientes: alguns são antioxidantes, previnem danos no DNA, suprimem a expressão de genes relacionados com a carcinogênese, estimulam fatores de crescimento e modulam níveis hormonais assim como o sistema imunológico (DOLL; PETO, 1981).

Em 1997, após uma extensa revisão de todas as evidências apresentadas na literatura, o grupo de trabalho conduzido pela World Cancer Research Foundation concluiu que: “o câncer está relacionado com fatores ambientais, dos quais os mais importantes são: o tabaco; a alimentação e fatores relacionados como massa corpórea e

atividade física e exposição à carcinógenos no ambiente de trabalho ou outros locais” (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2007).

Diversos estudos epidemiológicos indicam que a ingestão de carne vermelha, gordura animal e alguns óleos derivados de plantas pode estar relacionada com o aumento da incidência de alguns tipos de cânceres. Por outro lado, a ingestão de frutas, hortaliças, peixes e seus óleos parece estar relacionada com um efeito preventivo ou protetor contra determinadas neoplasias (KINLEN 1982; BRADBURY, APPLEBY, KEY, 2014; BOUVARD et al., 2015).

Ainda nesse sentido, e também refletindo a importância de estudos da relação dieta-nutrição-câncer, um estudo da Organização Mundial de Saúde em conjunto com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer estimou que em 2025, ocorrerão mais de 19 milhões de casos novos de câncer no mundo, devido, principalmente, ao aumento da expectativa de vida e à adoção de estilos de vida cada vez mais “ocidentalizados”, incluindo a alimentação. O estudo ressalta, ainda, que 1/3 desses cânceres pode ser prevenido e 1/3 curável, sendo responsabilidade dos governantes dos países de instituir medidas para educação da população quanto à mudança de seus hábitos comportamentais. Os principais alvos seriam ainda o combate ao tabagismo e a adoção de dietas adequadas, além do controle de infecções como as causadas pelo HCV (IARC, 2013).

2.6 Quimioprevenção do câncer

A quimioprevenção do câncer foi definida pela primeira vez em 1976 e pode ser considerada uma forma de prevenir a doença com a intervenção com compostos sintéticos ou naturais durante as etapas iniciais da carcinogênese, ou seja, antes do estabelecimento da etapa de progressão (SPORN et al., 1976; STEWARD, BROWN 2013).

Existem, basicamente, três abordagens para minimizar o impacto do câncer. Essas abordagens são denominadas quimioprevenção primária, secundária e terciária. A quimioprevenção primária tem como alvo indivíduos saudáveis. Nesse caso, a intervenção seria em grandes grupos populacionais com agentes quimiopreventivos de reduzida toxicidade. A abordagem da quimioprevenção secundária seria direcionada a pacientes portadores de lesões reconhecidamente pré-neoplásicas ou a indivíduos com predisposições genéticas ou que estão sujeitos a maior exposição a carcinógenos ou ainda, pacientes previamente tratados por meio de quimioterapia e/ou radioterapia (HONG; SPORN, 1997). A quimioprevenção terciária seria a intervenção que tem como objetivo evitar metástases ou recidivas do câncer e ainda prevenir uma nova neoplasia primária em pacientes supostamente curados de sua doença inicial (HONG 2003; DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Agentes quimiopreventivos podem ser classificados em bloqueadores ou supressores, atuando especificamente durante as fases de iniciação e promoção da carcinogênese, respectivamente. Alguns compostos podem atuar em ambas as etapas sendo classificados como bloqueadores e supressores do processo neoplásico. A caracterização dos mecanismos quimiopreventivos dos agentes bloqueadores e

supressores podem contribuir para a elucidação de aspectos fundamentais da carcinogênese e para a seleção de agentes quimiopreventivos para serem utilizados em seres humanos (WARGOVICH et al., 2000; ONG et al., 2011).

Diversos agentes quimiopreventivos até agora identificados são compostos bioativos presentes, principalmente, em frutas e hortaliças (CBAs). Estes apresentam propriedades pleiotrópicas, ou seja, atuam em diversas vias moleculares relacionadas com a carcinogênese. Assim, podem inibir a proliferação celular, induzir a apoptose, aumentar a expressão de genes supressores de tumor ou inibir a expressão de oncogenes. Para tanto, CBAs podem modular a carcinogênese por mecanismos genéticos, epigenéticos ou ambos (GERHAUSER 2013).

2.7 Ácido butírico e tributirina

Além de serem fontes de CBAs, frutas e hortaliças contêm concentrações significativas de fibras alimentares. Observações iniciadas na década de 1960 identificaram que o consumo destas últimas pode modular o desenvolvimento de diversas afecções, como diverticulite, apendicite e câncer de cólon (BURKITT, 1969). As fibras alimentares são constituídas por polissacarídeos não amiláceos que são fermentados por bactérias colônicas produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os principais AGCC, como acético, propiônico e butírico (AB), foram testados em linhagens celulares transformadas, nas quais o AB apresentou importante atividade inibitória do crescimento celular (GINSBURG et al., 1973). A estrutura relativamente simples do AB, um ácido graxo constituído por quatro átomos de carbono, foi descrita como responsável pela sua atividade diferenciadora de células leucêmicas, (LEDER,

LEDER, 1975). Por apresentar potencial quimioterápico, o AB foi considerado como uma possível molécula de escolha para terapia na leucemia. Assim, foram desenvolvidos estudos clínicos e farmacológicos que utilizaram butirato, forma dissociada do AB, em pacientes leucêmicos (NOVOGRODSKY et al., 1983; MILLER et al., 1987; REPHAELI et al., 1994) que resultou na remissão parcial da doença (REPHAELI et al., 1994). Mesmo na dosagem de 1,5 g/Kg de peso corpóreo (p.c)/dia de butirato por via endovenosa durante 17 dias, este não produziu efeitos tóxicos (MILLER et al., 1987; REPHAELI et al., 1994). A manutenção da concentração plasmática de butirato em torno de 0,5 mM, que é a mesma utilizada em estudos *in vitro*, está relacionada com maior atividade terapêutica (MILLER et al., 1987).

A meia vida do butirato é de 5 min quando administrado em roedores. Em seres humanos, a meia vida assume comportamento bifásico; em 30s ocorre uma acelerada excreção e após a ligação do butirato com proteínas plasmáticas a sua meia vida atinge 14 min (DANIEL et al., 1989). Apesar da sua reduzida toxicidade, a rápida eliminação do butirato é um fator limitante para sua aplicação clínica.

A meia-vida do butirato pode ser aumentada significativamente quando administrada na forma de tributirina (TB) que é um triacilglicerol constituído por três moléculas de AB esterificados com o glicerol. A hidrólise completa de 1 mol de TB por lipases fornece 2 moles de butirato e 1 mol de 2-monobutirilglicerol. A meia vida da TB após a administração por via oral em roedores é de 40 min (SU et al., 2006) e até mesmo o fornecimento de uma dose de 8,2 g/kg p.c em roedores por via parenteral ou oral não apresenta efeitos tóxicos (EGORIN et al., 1999). O fato da TB poder ser administrada por via oral representa vantagens, pois além de apresentar comportamento

farmacocinético favorável, suas características organolépticas são melhores do que as do butirato.

Com relação às propriedades antineoplásicas da TB, demonstrou-se em linhagem de câncer de próstata que o tratamento com essa substância causou bloqueio da proliferação e indução da apoptose em comparação à administração equimolar de AB (KUEFER et al., 2004). A TB mostrou-se também eficiente na indução da apoptose em linhagem de células de câncer de mama (HEERDT et al., 1999) e de HCC (WATKINS et al., 1999). *In vivo*, a TB apresentou atividade quimiopreventiva em ratos submetidos à modelo de hepatocarcinogênese (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012; de CONTI et al., 2013, GUARIENTO et al., 2014).

2.8 Lipídios Estruturados

Modificações estruturais que possam potencializar a ação do butirato presente na TB são úteis para a utilização no contexto da quimioprevenção do câncer. Assim, nesse sentido, Su e colaboradores (2006) demonstraram que a administração de uma emulsão lipídica, constituída por fosfatidilcolina, colesterol, oleato de colesterol e tributirina, por via oral em ratos, aumentava significativamente as concentrações plasmáticas de butirato, quando comparada à administração de somente TB, na mesma dose (2 g/Kg p.c). Outra emulsão, constituída por Tween 80[®], fosfatidilcolina e TB induziu a apoptose de células de melanoma B16-F10 e, também, impediu a formação de neoplasias no pulmão após o implante destas mesmas células em camundongos, quando comparada à administração intraperitoneal de butirato (KANG et al., 2011).

Vários estudos demonstraram que ácidos graxos da família ω -3 [C18:3n-3 (ácido α -linolênico; C20:5n-3 (ácido eicosapentaenoico) e C22:6n-3 (ácido docosahexaenóico)] sensibilizam células neoplásicas em cultura ou implantadas em animais para o tratamento com fármacos antineoplásicos como doxorrubicina, 5-fluorouracil, metotrexato e irinotecano (BIONDO et al., 2008). Resultado semelhante foi observado em pacientes que recebiam tratamento quimioterápico em conjunto com suplementos com ω -3 (BAUER, CAPRA, 2005; READ et al., 2007). Com base nestas observações, foram desenvolvidos sistemas de carreamento que utilizam ácidos graxos da família ω -3 com potencial de aumentar o efeito terapêutico de fármacos antineoplásicos, como ocorre com o ácido alfa linolênico (AAL) conjugado com a doxorrubicina, já que uma ligação amida é formada entre o ácido graxo e o fármaco (HUAN et al., 2009; HUAN et al., 2012). Uma importante fonte de AAL é o óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*). Este óleo foi avaliado em modelos experimentais de carcinogênese de próstata (DEMARK-WAHNEFRIED et al., 2008) e de cólon (WILLIAMS et al., 2007; BOMMAREDDY et al., 2009) apresentando, em ambos, atividade quimiopreventiva. O AAL também foi incorporado em sistemas de carreamento de pequenos RNAs de interferência para o fígado (YU et al., 2012), ou de CBAs como a curcumina (SONG et al., 2014). Assim, a atividade quimiopreventiva da TB poderia ser aumentada com a utilização do AAL como carreador do butirato.

Uma estratégia para a síntese de um sistema de carreamento do butirato pelo AAL é a interesterificação da TB com o óleo de linhaça, uma vez que a mistura constituída por estes lipídios é submetida à ação de lipase 1,3 específica, possibilitando a produção de novos triacilgliceróis. Estes são, então, denominados lipídios estruturados

(STEIN,1999). Assim, em uma mesma molécula de glicerol, poderão estar esterificados AB e AAL distribuídos nas posições *sn-1*, *sn-2* ou *sn-3* (**figura 1**).

Lipases atuam predominantemente nas posições *sn-1* e *sn-3* das ligações éster de triacilgliceróis, liberando ácidos graxos livres e 2-monoacilgliceróis.

Figura 1: Esquema representativo da produção de lipídios estruturados. (A) mistura de triacilgliceróis a ser interesterificada. (B) Lipídios estruturados obtidos por ação de lipase 1,3 específica. Os lipídios estruturados apresentam ácidos graxos esterificados com o glicerol que não estavam presentes na mistura original.

Uma emulsão contendo lipídios estruturados de ácidos graxos de cadeia curta nas posições *sn-1* e *sn-3* com ácidos graxos de cadeia longa na posição *sn-2* apresentou aumento na meia vida em ratos quando comparada com uma contendo apenas ácidos graxos de cadeia curta (HEDEMAN, et al., 1996), como a TB. Outro estudo verificou que ácidos graxos de cadeia média presentes em uma emulsão que também apresentava ácidos graxos de cadeia longa eram rapidamente hidrolizados, conforme

verificado in vivo (CHRISTENSEN, et al., 1995). Dessa forma, é possível que lipídios estruturados que apresentem AB nas posições sn-1 e sn-3 e AAL na sn-2 apresentem maior potencial quimiopreventivo do que a TB em modelo in vivo de hepatocarcinogênese.

Assim, neste estudo, foram produzidos lipídios estruturados pela interesterificação da TB (inibidor de HDAC) com o óleo de linhaça (fonte natural de AAL). O potencial quimiopreventivo destes lipídios estruturados foi avaliado no modelo de hepatocarcinogênese do RH e foram investigados possíveis mecanismos que podem estar envolvidos com HCC. Desta forma, além da abordagem original com relação à síntese dos lipídios estruturados, o presente trabalho avançou no conhecimento ao relacionar modificações epigenéticas pouco estudadas, mas que apresentam impacto importante no desenvolvimento do HCC e em sua quimioprevenção.

3 OBJETIVO

Produzir lipídios estruturados com potencial atividade quimiopreventiva contra o câncer, e avaliá-los em modelo de hepatocarcinogênese em ratos na fase de iniciação/promoção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo dos lipídios estruturados

Para o preparo dos lipídios estruturados foi utilizada uma mistura de TB (Aldrich, EUA) e óleo de linhaça [LIN, (Vital Atman, Brasil)] na proporção 1.35:1.0 (massa/massa), que equivale a 5 moles de TB e 2 moles de ácido alfa linolênico. Esta proporção foi calculada para que o triacilglicerol predominante apresente 2 moléculas de butirato. A mistura foi interesterificada em um reator tubular de vidro (**figura 2**) com 70g da lipase 1,3 específica de *Thermomyces lanuginosa* imobilizada (Lipozyme® TL IM, Novozymes, Brasil) com atividade de 250 IUN/g. Óleo de soja foi introduzido no reator com fluxo de 1mL/min para a remoção de água e bolhas de ar da enzima. A mistura de TB com EST foi bombeada para o reator quando este atingiu 60°C, em um fluxo de 1mL/min, para que o tempo de residência fosse de 1h (SILVA et al., 2012).

Figura 2: Esquema da produção dos lipídios estruturados. A mistura de tributirina com óleo de linhaça foi bombeada para um reator com a enzima, onde foi realizada a reação de interesterificação. Todo o sistema foi mantido a 60°C. Adaptado de Silva et al., 2012.

4.2 Composição de ácidos graxos

Os ácidos graxos dos triacilgliceróis presentes na TB, LIN, mistura da TB com LIN (MIS) e dos lipídios estruturados (EST) foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). Assim, 150-200 mg de cada lipídio foram saponificados com 3,5 mL de solução metanólica 0,5 N de hidróxido de potássio, em temperatura mantida a 75-80°C. Em seguida, foram adicionados 10,5 mL de solução de esterificação (cloreto de potássio e ácido sulfúrico em metanol). A mistura foi submetida a refluxo em balão de fundo redondo e transferida para um funil de separação, com a adição de 20 mL de éter de petróleo e 40 mL de água destilada. A camada aquosa foi descartada e a lipídica foi novamente lavada por mais 2 vezes com água destilada. Finalmente, a porção lipídica foi separada e transferida para tubo de ensaio com tampa. O solvente foi evaporado em banho-maria a 40°C sob corrente de nitrogênio. Hexano foi adicionado para a realização da análise. A análise dos FAMES foi conduzida em cromatógrafo a gás (modelo 430 GC, Varian Chromatograph Systems, EUA) equipado com injetor automático CP 8412 e detector de ionização de chama. O software Galaxie (Varian Chromatograph Systems, EUA) foi utilizado para identificar e quantificar os picos. As amostras foram injetadas (1 µL, 250°C) em coluna capilar de sílica (30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno), revestidas com 0,2 µm de polietileno glicol (SP-2560, Supelco, EUA). O gás de arraste foi hélio na pressão isobárica de 37 psi, a velocidade linear foi de 20 cm/s e o gás make up foi hélio a 29 mL/min. A temperatura do injetor e do detector foi de 250°C, enquanto a do forno foi inicialmente

ajustada para 75°C por 15 min e programada para atingir 140°C em uma razão de 5°C/min e, novamente programada até 240°C em uma razão de 4°C/min. O forno foi mantido a 240°C por 30 min. A composição qualitativa dos ácidos graxos foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos produzidos pelas amostras metiladas com aqueles obtidos com os respectivos padrões. A composição quantitativa foi obtida pela normalização da área e expressa como porcentagem molar. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os valores foram expressos como a média das três corridas.

4.3 Composição de triacilgliceróis

As amostras de TB, LIN, MIS e EST foram dissolvidas em acetona (5 mg/L) e diretamente analisadas em cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC Shimadzu Prominence 20A; Shimadzu Corporation, Japão), equipado com detector de espalhamento de luz Shimadzu ELSD-LTII e duas colunas Supelcosil TM C18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm). As análises foram iniciadas com fluxo de 1 mL/min de uma mistura de acetona/acetonitrila (1:1), com um gradiente crescente de clorofórmio a 20% em 60 min. Após esse período a composição do solvente foi mantida por 20 min e finalmente retornou à composição inicial em 85 min. Os picos foram identificados utilizando padrões de triacilgliceróis puros e foi considerada a ordem da eluição de acordo com o número de carbono equivalente. As análises foram conduzidas em duplicatas e os resultados foram expressos como valores médios.

4.4 Regioespecificidade dos ácidos graxos

Amostras de 250 mg de TB, LIN, MIS e EST foram dissolvidas em 5 mL de clorofórmio deuterado em tubos de 5 mm apropriados para ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de ^{13}C dos lipídios foram obtidos em espectrômetro de RMN (Bruker Advance DPX, EUA) na frequência de 300 MHz com largura espectral de 2332,090 Hz, com pulso de 10,2 μs e atraso de relaxamento de 30s. O ^{13}C foi obtido na frequência de 75,8 MHz com 5 mm da sonda multinuclear operando a 30°C. Os resultados demonstraram a composição de ácidos graxos saturados e insaturados nas posições *sn-2* e *sn-1* ou *sn-3*.

4.5 Calorimetria de fusão e cristalização

As análises calorimétricas do comportamento de fusão e cristalização do LIN, MIS e EST foram realizadas em Analisador Térmico (modelo DSC 4000, Perkin-Elmer, EUA) equipado com Intracooler SP. A temperatura de calibração do equipamento foi obtida com padrão de In (temperatura inicial de fusão = 156,5°C) e a temperatura de base foi determinado com cadinho de alumínio vazio. A calibração para a determinação do calor envolvido na mudança de fase (fusão/cristalização) foi realizada somente com In (ΔH para fusão = 28,45J/g). Para as curvas de cristalização, aproximadamente 8 mg de cada amostra foram acondicionadas em recipientes de 50 μL e lacrados hermeticamente. Em seguida, as amostras foram mantidas a 80°C por 10 min e, após este período, resfriadas na razão de 10°C/min a -60°C. Após 30 min nesta temperatura, a curva de fusão foi obtida por aquecimento na razão de 5°C/min até 80°C. As

temperaturas dos picos de fusão endotérmicos foram calculadas com o software DSC-Pyris (Perkin-Elmer, EUA).

4.6 Animais

Foram utilizados 65 ratos Wistar machos, com pesos iniciais entre 70 e 80 g obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF/IQ-USP). Os animais foram mantidos (no máximo 4) em gaiolas de polipropileno com tampa de aço inoxidável, com maravalha previamente esterilizada. O ambiente em que os animais permaneceram durante todo o período experimental apresentava temperatura constante (22°C) e umidade do ar controlada em 55%. O ar era trocado 20 vezes por hora e o ciclo de iluminação claro/escuro foi de 12h, com início às 7h00. Todo procedimento experimental com os animais foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF-USP (**anexo 1**). Os pesos dos animais e o consumo de ração foram avaliados diariamente.

4.7 Doses dos lipídios estruturados e dos seus controles

As doses do EST, MIS e LIN foram calculadas para fornecerem a mesma quantidade energética da TB (200 mg/100g pc), já que com esta dose foi observada atividade quimiopreventiva na hepatocarcinogênese experimental (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; CONTI et al., 2012; CONTI et al., 2013). Assim, foram levados em conta os percentuais molares dos ácidos graxos presentes no EST, MIS e LIN, obtidos conforme descrito no item 3.2 e seus respectivos calores de combustão de

acordo com o CRC Handbook (2005). Foi considerada para o cálculo a hidrólise completa, ou seja, um mol de triacilglicerol fornece, para efeito de cálculo, 3 moles de ácidos graxos e um de glicerol. Foi utilizado, ainda, maltodextrina como controle isocalórico da TB (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; CONTI et al., 2012; CONTI et al., 2013).

4.8 Modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente” (RH)

Para indução da hepatocarcinogênese foi utilizado o modelo do RH. Assim, os animais receberam, por via intraperitoneal, uma única dose [20 mg/100 g de peso corpóreo (p.c)] do agente iniciador dietilnitrosamina (DEN; Sigma, EUA) dissolvido em solução de cloreto de sódio 0,9%. Após um período de recuperação de 2 semanas, os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses em dias consecutivos, por gavagem, de 2-acetilaminofluoreno [2-AAF (Sigma, EUA); 2 mg/100 g p.c] dissolvido em dimetilsufóxido (Sigma, EUA) e óleo de milho (Mazola®, Cargill, Brasil). Vinte e quatro horas após a última aplicação de 2-AAF os animais foram submetidos a um potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial a 70% (SOLT, FARBER, 1976; CASTRO et al., 2010). Finalmente, no segundo e no quarto dias após a hepatectomia parcial, os animais receberam 2 doses adicionais de 2-AAF (0,75 mg/100 g p.c e 2 mg/100 g p.c, respectivamente).

4.9 Protocolo Experimental

Para avaliar a eventual atividade quimiopreventiva dos lipídios estruturados quando administrados a ratos Wistar submetidos ao modelo do RH continuamente durante a etapa de iniciação/promoção da hepatocarcinogênese, bem como mecanismos envolvidos, os animais foram submetidos aos procedimentos especificados a seguir (**Figura 3**).

Após um período de aclimação de 7 dias, exceção feita a 5 animais que constituíram o grupo não submetido ao modelo de hepatocarcinogênese (grupo “normal”) 60 ratos foram submetidos ao modelo do RH. Assim, esses animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 diferentes grupos experimentais:

Grupo maltodextrina (MD): composto por 12 animais que foram submetidos ao modelo do RH e receberam maltodextrina (Nidex®, Nestlé, Brasil; 300 mg/100g p.c/dia) como controle isocalórico, por gavagem.

Grupo óleo de linhaça (LIN): controle do grupo EST, composto por 12 animais que foram submetidos ao modelo do RH e receberam LIN (133 mg/100g p.c/dia) por gavagem.

Grupo tributirina (TB): controle do grupo EST, composto por 12 animais que foram submetidos ao modelo do RH e receberam TB (200 mg/100g p.c/dia) por gavagem.

Grupo mistura (MIS): controle do grupo ES, composto por 12 animais que foram submetidos ao modelo do RH e receberam as mesmas proporções de TB e LIN utilizadas na obtenção dos EST, porém sem o prosseguimento da reação de interesterificação enzimática, (165mg/100g p.c/dia) por gavagem.

Grupo estruturado (EST): composto por 12 animais que foram submetidos ao modelo do RH e receberam os lipídios obtidos por interesterificação enzimática da TB com LIN (165mg/100 g p.c/dia) por gavagem.

Os ratos receberam os tratamentos durante 8 semanas consecutivas.

Figura 3: Esquema experimental. Tratamento de ratos com os lipídios estruturados ou com seus controles durante a fase de iniciação/promoção do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”.

4.10 Eutanásia dos animais

Duas horas antes da eutanásia, foi aplicada, por via intraperitoneal, bromodesoxiuridina (BrdU, 100 mg/kg de p.c., Sigma, EUA). Em seguida, os animais foram anestesiados com éter (Merk, Alemanha), seguindo-se a laparotomia. A eutanásia ocorreu pela secção da aorta abdominal e consequente choque hipovolêmico. Em seguida, foi retirado o fígado, seguindo-se, então, exame macroscópico do mesmo e também um fragmento do duodeno para controle da proliferação celular.

4.11 Exame macroscópico do fígado

O fígado de cada animal foi examinado quanto à presença em sua superfície de formações nodulares de coloração, em geral, esbranquiçada ou amarelada, que se distinguem do parênquima hepático. Fragmentos de fígado foram fixados em formalina tamponada a 10% ou congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80° C.

4.12 Dupla marcação imunoistoquímica para GST-P e BrdU

Após desparafinização e hidratação de cortes histológicos de tecido hepático, a peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ 3% em PBS, por 15 min. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de leite em pó desnatado 3% em PBS e, posteriormente, incubadas com o anticorpo primário anti-BrdU (GE Healthcare, Suécia) na diluição de 1:400 durante 16h a 4°C. Após, as lâminas foram tratadas com anticorpo

secundário universal conjugado a peroxidase (DAKO, Dinamarca) por 1h e reveladas por reação com diaminobenzidina (DAB – DAKO, Dinamarca). A fosfatase alcalina foi bloqueada com levamisole (DAKO, Dinamarca) durante 30 min, e, em seguida, ocorreu a incubação com o anticorpo anti-GST-P (MBL, Japão), na diluição de 1:1000 por 1h na temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com polímero conjugado a fosfatase alcalina por 45min, reveladas com *permanent red* (DAKO, Dinamarca) e contra-coradas com hematoxilina de Harris. Entre todas as etapas foi realizada lavagem dos cortes com tampão fosfato. A especificidade das marcações foi controlada subtraindo-se o anticorpo primário ou substituindo-o por soro de animal não imunizado.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio com platina motorizada (Imager.M2, Zeiss, Alemanha) acoplado a sistema de análise de imagens Axio Vision (Zeiss, Alemanha). A morfometria foi expressa na forma de número e tamanho de LPN persistentes ou em remodelação, e a porcentagem da área do corte histológico ocupado pelas LPN. A quantificação da proliferação celular foi expressa na forma de núcleos de hepatócitos positivos para BrdU/mm² em área de LPN persistentes ou em remodelação, ou área de tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas, tanto dos grupos submetidos ao modelo do RH, como do grupo Normal.

4.13 Avaliação da apoptose

As células em apoptose foram identificadas por critérios morfológicos em lâminas com tecido hepático coradas com H&E. Foram consideradas células em apoptose aquelas que apresentavam compactação citoplasmática e nuclear. Os

resultados foram expressos como o número de células em apoptose/mm² de área de LPN (persistente ou em remodelação) e área de tecido não pré-neoplásico ao redor da mesma.

4.14. Quantificação hepática de AB e AAL

A extração do AB foi conduzida de acordo com estudos anteriores (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012). Assim, amostras de tecido hepático foram pulverizadas em graal de porcelana com N₂ líquido e homogenizadas em um Potter com 50 mM PMSF (Sigma-Aldrich, EUA) e 50 µL de ácido etilbútrico (Sigma-Aldrich, EUA) em acetonitrila. Os homogenatos foram centrifugados a 13.000 g na temperatura de 4°C durante 15 min e os sobrenadantes foram coletados e armazenados em vials a -20°C até o momento da injeção no cromatógrafo. Foram injetados 2 µL em sistema de cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas GC HP6890 (Agilent, EUA) equipado com coluna CP Wax 58 – FFAP (Varian, 25m x 0,32 m x 0,2 µm). A injeção foi realizada em modo splitless a 200°C. O gás de arraste foi hélio no fluxo de 1mL/min. A temperatura do forno foi mantida a 50°C por 3 min e elevada a 250°C na razão de 20°C/min. O efluente foi monitorado pelo detector seletivo de massas HP5973 (Agilent, EUA) com ionização de impacto de elétrons com uma fonte de íons a 70 eV a 200°C.

A extração do AAL foi conduzida de acordo com o método clássico de Folch (FOLCH, LEES, SLOANE STANLEY, 1957), com modificações. Amostras de tecido hepático foram pulverizadas em graal de porcelana com N₂ líquido e homogenizadas em um Potter com uma mistura 2:1 de clorofórmio e metanol (v/v) com 50 mM PMSF

(Sigma-Aldrich, EUA) e 1mg/ml de ácido nonadecanóico (Sigma-Aldrich, EUA). O homogenato foi transferido para tubos cônicos com tampa, que permaneceram em mesa agitadora por uma noite. A fase metanólica foi coletada e armazenada em frascos e -20°C até o momento da injeção no cromatógrafo. Foram injetados 2 µL em sistema de cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas GC HP6890 (Agilent, EUA) equipado com coluna SPB-50 (Supelco, 30 m x 0,35 mm x 0,25 µm). A injeção foi realizada em modo splitless a 200°C. O gás de arraste foi hélio no fluxo de 1mL/min. A temperatura do forno foi mantida a 50°C por 3 min e elevada a 250°C na razão de 20°C/min. O efluente foi monitorado pelo detector seletivo de massas HP5973 (Agilent, EUA) com ionização de impacto de elétrons com uma fonte de íons a 70 eV a 200°C.

4.15 Western blot para modificações em histonas

Extratos ácidos de células foram preparados a partir de amostras congeladas de tecidos hepáticos homogeneizadas com tampão de lise [10mM HEPES (pH 7,9), 1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 5 mM butirato de sódio, 0,5 mM DTT e 1,5 mM PMSF]. Os lisados foram centrifugados a 14.000 g a 4°C durante 5 min e o precipitado foi dissolvido com 0,2N HCl, permanecendo a 4°C por uma noite. Os precipitados insolúveis ao HCl foram separados por centrifugação (500 g, 5 min, 4°C) e descartados. O sobrenadante foi neutralizado com 2N NaOH e estocado a -80°C (TRYNDYAK et al., 2006). As concentrações protéicas foram determinadas pelo kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, EUA).

A análise do padrão de acetilação ou trimetilação da histona H3 no resíduo de lisina 9 (H3K9) e no resíduo de lisina 27 (H3K27) foi realizada por western blot. 50 µg

de histonas foram separadas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 15% imerso em tampão tris-glicina em cuba de eletroforese vertical Mini Tetra Cell (Bio-Rad, EUA) por, aproximadamente, 2h a 120V. As proteínas foram, então, transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-ECLTM (GE Healthcare, Suécia), com poro de diâmetro 0,2 μ m, por 30 min. A eficiência da transferência foi verificada com a coloração da membrana com Ponceau-S (UBS, EUA) e, em seguida, lavada com PBS (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KCl 2,68 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM e água ultra-pura, pH 7,4) e água. O bloqueio da membrana foi realizado com solução 3% de soro de albumina bovina em PBS durante 1 h em temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpos primários anti-H3K9ac (Millipore, EUA) ou anti-H3K27ac (Millipore, EUA) ou anti-H3K3me3 (Millipore, EUA) ou anti-H3K27me3 (Millipore, EUA) ou, ainda, anti-H4 (Millipore, EUA) na diluição 1:1000 em solução de 0,3% de soro de albumina bovina em PBS, por uma noite a 4°C. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP anti-imunoglobulina de coelho (Amersham Biosciences, EUA) na diluição 1:10.000 em PBS durante 1h. As histonas foram detectadas por quimioluminescência (ECL Advanced, GE Healthcare, Suécia) e a intensidade das bandas foi quantificada por densitômetro (ImageQuant 400, GE Healthcare, Inglaterra) equipado com software específico (Quantity One software, version 4.6.3, GE Healthcare, Inglaterra). As intensidades das bandas da H3K9ac, K3K27ac, H3K9me3 e H3K27me3 foram normalizadas com a produzida pela H4. Os resultados foram expressos como porcentagem de intensidade de banda em relação ao grupo normal.

4.16 Análise da expressão do RASSF1A, NORE1A, CAV-1 e dos genes envolvidos nas modificações em histonas por RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction).

O RNA total do tecido hepático foi extraído com mRNAeasy Mini Kit (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após quantificação em espectrofotômetro específico para ácidos nucleicos (Nanodrop 1000 Thermo Scientific, EUA), 2µg foram utilizados para a transcrição reversa de acordo com as instruções do Kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for qRT-PCR (Invitrogen, EUA). Foi realizado, em seguida, o ensaio de expressão gênica para RT-PCR, composto pelos seguintes genes: RASSF1A (NM-001007754, Qiagen, EUA); NORE1A (Rn00571287_m1, Applied Biosystems, EUA); CAV-1 (Rn00755834_m1, Applied Biosystems, EUA); Kdm4a (Rn01417086_m1, Applied Biosystems, EUA); Kdm6a (Rn01430760_m1, Applied Biosystems, EUA); Suv39h1 (Rn01528294_g1, Applied Biosystems, EUA); Suv420h1 (Rn01759779_m1, Applied Biosystems, EUA); Suv420h2 (Rn02111012_s1, Applied Biosystems, EUA); Riz1 (Rn01516793_m1, Applied Biosystems, EUA); Ezh2 (Rn01500685_m1, Applied Biosystems, EUA); Hdac1 (Rn01525918_m1, Applied Biosystems, EUA); Hdac2 (Rn01193634_g1, Applied Biosystems, EUA); Hdac3 (Rn00584926_m1, Applied Biosystems, EUA); Hdac4 (Rn01464246_m1, Applied Biosystems, EUA); Hdac6 (Rn01528283, Applied Biosystems, EUA) e Hdac8 (Rn01419046, Applied Biosystems, EUA). As reações foram realizadas em placas de 96 poços em termociclador de tempo real (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, EUA). Cada placa apresentava um gene experimental e o controle *Gapdh* (Rn01775763_g1, Applied Biosystems, EUA). Todas

as amostras foram aplicadas em duplicata. A quantidade relativa de cada mRNA transcrito foi avaliada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (SCHMITTGEN, LIVAK, 2008).

4.17 Análise estatística

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (Brown-Forsythe). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa STATISTICA 7.0 (Statsoft, EUA) e adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Na constatação de que foram satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de comparação de médias de amostras independentes, as análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância unidimensional (ANOVA) seguida do teste de Tukey não pareado.

5 RESULTADOS

5.1 Produção de lipídios estruturados

Neste estudo, a produção de lipídios estruturados (**Figura 7 A**) ocorreu pela interesterificação de uma mistura de 5 moles de TB com 2 moles de ácido alfa linolênico, já que esta proporção favorece a formação de triacilgliceróis com 2 moléculas de AB. Deve-se considerar também que a elevada proporção de moléculas de TB (5 moles) foi escolhida para minimizar as perdas de AB durante a reação de interesterificação devido a sua elevada volatilidade. A **Tabela 1** mostra a composição de ácidos graxos da TB, LIN, MIS e EST obtida por cromatografia a gás. Como esperado, a interesterificação não afetou o grau de saturação e não causou a isomerização. O resultado confirma que a interesterificação não alterou o perfil de ácidos graxos da MIS e dos EST, mas gerou uma redução de AB nos EST com consequente aumento de outros ácidos graxos quando comparado a MIS. Esta perda de AB é devida à temperatura utilizada durante a reação de interesterificação e à volatilidade deste ácido graxo.

Tabela 1. Composição de ácidos graxos da tributirina (TB), óleo de linhaça (LIN), mistura (MIS) e lipídios estruturados (EST) obtidos por cromatografia a gás.

	TB	LIN	MIS	EST
4:0	100	0	69,7±2,39	63,7±2,35
16:0	0	6,57±0,04	2,0±0,15	2,4±0,16
18:0	0	5,09±0,01	1,6±0,13	1,9±0,13
18:1	0	22,24±0,06	6,8±0,52	8,2±0,51
18:2	0	14,46±0,03	4,4±0,34	5,3±0,35
18:3	0	51,64±0,05	15,6±1,26	18,5±1,25

Os resultados estão expressos em percentual molar (média ± erro padrão da média).

Alteração na composição de ácidos graxos não indica se ocorreu a interesterificação. Para tanto, a determinação da composição em triacilgliceróis é a análise mais adequada. Assim, a **Figura 4** representa a composição em triacilgliceróis da TB, LIN e EST obtida por cromatografia líquida de alta eficiência. Como esperado, TB apresentou somente BBB (B = 4:0). Os triacilgliceróis mais abundantes no LIN foram LnLnLn [Ln = 18:3(n-3)], LLLn [L = 18:2(n-6)], LLnLn, OLL (O = 18:1), OLLn, LLL e OLnLn. O perfil de triacilgliceróis dos EST permite identificar a nova composição formada pela reação de interesterificação enzimática uma vez que os 3 AB presentes inicialmente na TB foram redistribuídos com os ácidos graxos provenientes do óleo de linhaça. Assim, ocorreu a formação de novos triacilgliceróis como BBLn, BBL, BBO, BLnLn, BLLn e BOLn. Aproximadamente 82% dos triacilgliceróis presentes nos lipídios estruturados apresentaram 2 AB em sua estrutura, conforme planejado.

Potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados obtidos por interesterificação da tributirina com óleo de linhaça na hepatocarcinogênese.

Figura 4. Cromatogramas representativos da composição em triacilgliceróis da tributirina, óleo de linhaça e lipídios estruturados.

A análise por RMN é um método que permite a identificação do grau de saturação dos ácidos graxos ligados nas diferentes posições da molécula de glicerol. Como TB é um lipídio constituído por glicerol e 3 moléculas de AB, então, suas posições *sn-1,2,3* foram ocupadas por ácidos graxos saturados. LIN apresentou distribuição regioespecífica típica dos óleos vegetais, já que a posição *sn-2* foi predominantemente ocupada por ácidos graxos insaturados, enquanto as posições *sn-1,3* tiveram 19,7% de ácidos graxos saturados e 80,3 % de ácidos graxos insaturados (**Tabela 2**). MIS apresentou distribuição regioespecífica de ácidos graxos intermediária da TB e LIN. Quando comparada à MIS a reação de interesterificação enzimática promoveu discreto aumento da porcentagem de ácidos graxos saturados presentes na posição *sn-2* e uma redução na porcentagem destes ácidos graxos nas posições *sn-1,3*.

Tabela 2. Distribuição regioespecífica do grau de saturação dos ácidos graxos da tributirina (TB), óleo de linhaça (LIN), mistura (MIS) e lipídios estruturados (EST).

	<i>sn-1,3</i> (%)		<i>sn-2</i> (%)	
	Saturado	Insaturado	Saturado	Insaturado
TB	100	0	100	0
LIN	19,74 ±0,18	80,26±0,19	0	100
MIS	59,29±0,19	40,70±0,19	49,70±0,05	50,29±0,05
EST	54,25±0,17	45,75±0,17	54,54±0,16	45,57±0,16

Dados expressos como média ± erro padrão da média.

Embora os valores da distribuição regioespecífica da MIS estejam próximos aos valores dos EST, os espectrogramas apresentados na **Figura 5** demonstram que os EST são totalmente diferentes da simples mistura da TB com LIN.

Figura 5. Espectrogramas obtidos por RMN da distribuição regiospecífica do grau de saturação de ácidos graxos da tributirina (A), óleo de linhaça (B), mistura (C) e lipídios estruturados (D).

Devido ao reduzido ponto de fusão dos lipídios utilizados, não foi possível determinar os picos de cristalização até -60°C por calorimetria exploratória diferencial. LIN apresentou pico de fusão a $-30,17^{\circ}\text{C}$ (**Figura 6A**), comportamento típico de um óleo com elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados. Quando TB foi adicionada ao LIN, a mistura resultante apresentou pico de fusão a $-41,4^{\circ}\text{C}$ (**Figura 6B**). Após a reação de interesterificação enzimática, não foi mais observado pico de fusão (**Figura**

6C). Esta observação indica que a reação de interesterificação produziu EST constituídos por triacilgliceróis distintos daqueles encontrados na TB e no LIN.

Figura 6. Curvas de temperatura de fusão do óleo de linhaça (A), mistura (B) e dos lipídios estruturados (C) obtidos por calorimetria exploratória diferencial.

5.2 Consumo de ração, pesos corpóreo e hepático e análise macroscópica do fígado

Neste estudo, após a síntese e caracterização dos lipídios estruturados, o potencial quimiopreventivo destes foi avaliado em modelo de hepatocarcinogênese. Assim, durante 8 semanas consecutivas, ratos foram tratados, em doses isocalóricas, com maltodextrina (grupo MD), óleo de linhaça (grupo LIN), mistura de tributirina com óleo de linhaça (grupo MIS) lipídios estruturados (grupo EST) e submetidos ao modelo do RH. A **tabela 3** apresenta os dados referentes ao consumo de ração, peso corpóreo final, ganho de peso entre os grupos, assim como número médio de nódulos hepáticos por rato dos grupos MD, TB, LIN, MIS e EST. Não há diferença ($p > 0.05$) entre o consumo de ração, peso corpóreo final e ao ganho de peso entre os grupos, sugerindo ausência de toxicidade dos EST (WILSON, HARDISTY, HAYES, 2008). No que diz respeito ao peso hepático relativo, somente os grupos TB e EST apresentaram valores menores em relação ao controle MD ($p < 0.05$), que neste estudo pode ser reflexo do número de nódulos. Nesse sentido, ratos de todos os grupos apresentaram nódulos hepáticos, porém animais dos grupos TB e EST tiveram menor número médio de nódulos ($p < 0.05$) quando comparados ao do controle MD. Estes resultados confirmam a ocorrência de atividade quimiopreventiva da TB tal como observada em estudos anteriores (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; DE CONTI et al., 2012) e indicam o potencial quimiopreventivo dos EST.

Tabela 3. Consumo de ração, peso corpóreo final e ganho de peso, bem como peso hepático relativo, incidência total de nódulos e número médio destes dos animais submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente e tratados com maltodextrina (MD), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura (MIS) de TB com LIN ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção da hepatocarcinogênese.

Grupos (n)	Consumo de Ração (g/dia)	Peso Corpóreo Final (g)	Ganho (g)	Peso Hepático Relativo (g)	Incidência de nódulos (%)	Número médio de nódulos por rato
MD (6)	24,8 ± 0,9	277 ± 11	203 ± 7	3,7 ± 0,4	100	195,0 ± 161,9
LIN (8)	23,6 ± 0,7	287 ± 7	211 ± 6	3,2 ± 0,1	100	90,3 ± 72,9
TB (11)	23,7 ± 1,1	276 ± 7	201 ± 5	2,8 ± 0,1 ^a	100	27,1 ± 46,3 ^a
MIS (11)	24,0 ± 0,5	274 ± 7	198 ± 6	3,3 ± 0,2	100	146,5 ± 143,1
EST (10)	23,2 ± 1,1	280 ± 8	205 ± 7	2,9 ± 0,1 ^a	100	42,3 ± 53,8 ^a

Dados expressos na forma de média ± erro padrão da média; ^aDiferença em relação ao grupo MD segundo teste ANOVA seguido de Tukey p<0,05.

5.3 Morfometria de LPN positivas para GST-P

GST-P pertence à família de enzimas da glutathione-S-transferase e sua expressão tem sido caracterizada como marcador de LPN de ratos submetidos a modelos de hepatocarcinogênese química (IMAI et al., 1997). A **Tabela 3** apresenta os resultados da análise morfométrica das LPN GST-positivas persistentes (pLPN) ou em remodelação (rLPN) dos grupos MD (controle isocalórico), LIN, TB, MIS e EST. Os tratamentos com TB e EST resultaram em pLPN em menores ($p<0,05$) números em relação aos grupos MD e MIS. Em comparação ao grupo MD, não foi diferente do ponto de vista estatístico o número de pLPN constatado nos grupos LIN e MIS. Em relação ao tamanho médio de pLPN, este foi menor ($p<0,05$) nos grupos TB e EST quando os diversos grupos experimentais submetidos ao modelo do RH foram comparados em relação a este parâmetro ao grupo controle MD. Já em relação à porcentagem da área do corte ocupada por pLPN, esta foi menor ($p<0,05$) nos grupos TB e EST quando comparado ao grupo MD. A porcentagem da área do corte ocupada por pLPN do grupo LIN não diferiu estatisticamente do grupo MD. Com relação às rLPN, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo MD, quando avaliado o número, tamanho e área ocupada pelo corte por estas lesões. Estes dados estão de acordo com o observado à macroscopia e confirmam a ocorrência de atividade quimiopreventiva por parte da TB e dos EST quando administrados continuamente durante as fases de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Tabela 4. Análise morfométrica pela marcação com GST-P, demonstrando número de LPN por cm², tamanho médio das LPN (mm²) e porcentagem de área hepática ocupada pelas mesmas em animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura (MIS) de TB com LIN ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção da hepatocarcinogênese.

Grupos (n)	Lesões GST-P positivas					
	n ^o /cm ²		Tamanho médio (mm ²)		% área hepática	
	pLPN	rLPN	pLPN	rLPN	pLPN	rLPN
MD (6)	62 ± 4,3	58 ± 10	0,19 ± 0,04	0,09 ± 0,01	24,1 ± 4,1	12,5 ± 1,4
LIN (8)	44 ± 5,6	53 ± 6,7	0,12 ± 0,04	0,07 ± 0,01	16,7 ± 4,1	9,6 ± 1,3
TB (11)	29 ± 3,4 ^{a,b}	70 ± 6,5	0,03 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01	6,9 ± 1,9 ^c	9,6 ± 1,3
MIS (10)	55 ± 5,3	65 ± 9,0	0,11 ± 0,03	0,06 ± 0,01	18,7 ± 4,1	11,7 ± 0,9
EST (9)	29 ± 5,5 ^{a,b}	59 ± 5,7	0,04 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01	7,8 ± 2,4 ^c	9,1 ± 1,9

Dados expressos na forma de média ± erro padrão da média;

^a Estatisticamente diferente (p<0,05) quando comparado ao grupo MD de acordo com o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni;

^b Estatisticamente diferente (p<0,05) quando comparado ao grupo MIS de acordo com o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni;

^c Estatisticamente diferente (p<0,05) quando comparado ao grupo MD de acordo com o teste Chi-Square.

5.4 Proliferação celular e apoptose

Observou-se nos diversos grupos de animais submetidos ao modelo do RH que pLPN e rLPN apresentam maior (p<0,05) proliferação celular e apoptose do que seus respectivos surroundings (**Tabela 5**). Tais dados estão de acordo com a literatura que demonstra que a proliferação celular e a apoptose aumentam durante a hepatocarcinogênese (KUROIWA-TRZMIELINA, 2009; DE CONTI et al 2012). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos

experimentais em relação à proliferação celular e a apoptose do surrounding. Da mesma forma, pLPN e rLPN dos diferentes grupos experimentais não apresentaram diferenças significantes no que diz respeito à proliferação celular (**Tabela 5**). Entretanto, assim como já observado em estudos anteriores (KUROIWA-TRZMIELINA, 2009; DE CONTI et al 2012), a administração de TB (grupo TB) resultou em maior ($p < 0,05$) número de hepatócitos em apoptose e de corpos apoptóticos em rLPN do que aquele constatado nessas lesões de ratos tratados com MD (grupo controle MD) (**Tabela 5**). Ainda em comparação ao grupo MD, os grupos LIN e EST não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quanto ao número de hepatócitos em apoptose e de corpos apoptóticos em rLPN. Nenhuma diferença estatística foi constatada quando analisada a apoptose em pLPN entre os diferentes grupos experimentais. Quando calculado o índice de crescimento de pLPN (razão entre proliferação celular e apoptose), não foram constatadas diferenças entre os animais submetidos ao modelo do RH e os do grupo controle. Por outro lado, os grupos TB e EST apresentaram menores ($p < 0,05$) crescimento de rLPN, em comparação ao grupo controle MD, ao contrário dos grupos LIN e MIS em que esta diferença não foi observada (**Tabela 5**).

Tabela 5. Análise quantitativa de núcleos de hepatócitos positivos para BrdU ou de corpúsculos por mm² em pLPN, rLPN ou no tecido ao redor das lesões (surrounding), assim como a relação entre proliferação celular e apoptose em animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura (MIS) de TB com LIN ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção da hepatocarcinogênese.

Grupos (n)	BrdU (n°/mm ²)			Apoptose (n°/mm ²)			Índice de crescimento	
	pLPN	rLPN	surrounding	pLPN	rLPN	surrounding	pLPN	rLPN
MD (6)	7,2 ± 0,8	15,2 ± 2,4	2,2 ± 0,7*	2,1 ± 0,2	4,3 ± 0,4	0,13 ± 0,02*	3,4 ± 0,3	3,5 ± 0,3
LIN (8)	6,7 ± 0,8	13,8 ± 1,7	2,1 ± 0,4*	2,7 ± 0,4	4,2 ± 0,5	0,14 ± 0,03*	2,4 ± 0,2	3,2 ± 0,1
TB (11)	5,8 ± 1,3	10,1 ± 3,0	4,1 ± 1,3*	2,8 ± 0,5	9,1 ± 0,6 ^a	0,17 ± 0,02*	2,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2 ^a
MIS (10)	6,6 ± 2,1	13,1 ± 1,3	3,2 ± 0,5*	2,0 ± 0,4	4,1 ± 0,3	0,13 ± 0,03*	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,3 ^a
EST (10)	6,1 ± 0,4	11,4 ± 1,5	2,9 ± 0,6*	2,1 ± 0,4	4,7 ± 0,2	0,14 ± 0,02*	2,9 ± 0,1	2,4 ± 0,1

^a Estatisticamente diferente (p<0,05) quando comparado ao grupo MD de acordo com o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni;

*Estatisticamente diferente (p<0,05) quando comparado ao respectivo surrounding de acordo com o teste *t* de Student.

5.5 Quantificação hepática de AB e AAL

Apesar do AB ter sido considerado para o tratamento de pacientes com leucemias, seu uso é limitado devido as suas propriedades farmacocinéticas serem desfavoráveis. O seu pró-fármaco TB pode ser administrado por via oral e fornece concentrações significativas de butirato no fígado (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2011). EST também devem fornecer concentrações significativas de AB no tecido hepático, assim como também de AAL. Assim, foram determinadas as concentrações de AAL e de AB no fígado dos animais dos grupos MD, LIN, TB, MIS e EST por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas. Como esperado, os grupos LIN, MIS e EST apresentaram maiores ($p < 0,05$) concentrações de AAL por grama de tecido hepático em relação ao controle MD (**Figura 7 A**). Não foram constatadas diferenças estatísticas nas concentrações hepáticas desse ácido graxo entre os grupos TB e MD. Por outro lado, os grupos tratados com TB, MIS e EST apresentaram maiores ($p < 0,05$) concentrações de AB por grama de tecido hepático em relação ao grupo MD (**Figura 7 B**). Não foram observadas diferenças estatísticas nas concentrações de AB no tecido hepático dos animais tratados com LIN quando comparados aos controles. O grupo tratado com EST apresentou menor concentração de AB ($p < 0,05$) em relação ao TB (**Figura 7 B**).

Figura 7: Concentrações hepáticas de ácido alfa linolênico (A) e ácido butírico (B) de ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura (MIS) de TB com LIN ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção da hepatocarcinogênese. * Diferença em relação ao grupo MD; #diferença em relação ao grupo TB, $p < 0,05$ segundo teste ANOVA seguido de Tukey. $n = 6$.

5.6 Modificações em histonas

Alterações epigenéticas podem ser utilizadas como biomarcadores no desenvolvimento do HCC, já que estão presentes, principalmente, durante as fases de iniciação e promoção (HOSHIDA et al., 2010). Devido a sua potencial reversibilidade,

estas modificações podem se tornar alvos promissores de agentes quimiopreventivos (KOPELOVICH CROWELL, FRAY, 2003) e poderiam explicar os mecanismos de ação dos EST.

Nesse sentido, foram avaliadas neste estudo H3K9ac, H3K27ac, H3K9me3 e H3K27me3, conforme demonstrado na **Figura 8**. Os grupos LIN e MIS não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as intensidades de bandas da H3K9ac, H3K27ac, H3K9me3 e H3K27me3 em relação ao grupo controle isocalórico MD. Já o tratamento com TB resultou em maiores ($p < 0,05$) intensidades de banda de H3K9ac, H3K27ac, H3K9me3 e H3K27me3 quando comparado ao grupo MD. Embora o tratamento com EST não tenha resultado em alterações ($p > 0,05$) na intensidade das bandas da H3K9ac e H3K27ac em comparação ao observado no grupo MD, verificou-se que este aumentou significativamente ($p < 0,05$) a intensidade das bandas da H3K9me3 e H3K27me3 em comparação a este mesmo grupo controle (grupo MD).

Figura 8 Padrão de acetilação da H3K9 e H3K27 (H3K9ac e H3K27ac) e de trimetilação da H3K9 e H3K27 (H3K9me3 e H3K27me3) no fígado de ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura (MIS) de TB com LIN ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção da hepatocarcinogênese. *Diferença em relação ao grupo MD; $p < 0,05$ segundo teste ANOVA seguido de Tukey. $n = 6$.

5.7 Expressão gênica

Desmetilases de histonas compõem complexos multiprotéicos atuando sinergicamente com metiltransferases e desacetilases de histonas, bem como com receptores nucleares exercendo, desta forma, controle sobre a transcrição (ZHANG et al., 2010). Assim, de acordo com a **Tabela 6**, ratos tratados com MD não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação à expressão dos genes das desmetilases *kdm4a* e *kdm6a*, e nem dos genes das metiltransferases *suv39h1*, *suv420h1* e *suv420h2*, entre os diferentes grupos experimentais. Proteínas como *riz1* e *ezh2*, consistem em repressores da transcrição que modificam histonas e exercem importante papel na carcinogênese (ZHANG et al., 2010; AU et al., 2012; CONGDON et al., 2014). Em relação à expressão do gene *riz1*, não foram também constatadas neste estudo diferenças significantes entre os diversos grupos experimentais. Entretanto, em comparação ao grupo controle MD, o tratamento com TB resultou em redução ($p < 0,05$) da expressão de *ezh2*. Da mesma forma, ratos tratados com EST apresentaram cerca de 40% de redução da expressão de *ezh2* quanto comparados a animais do grupo MD (controles), embora esta diferença não tenha atingido significância estatística. A expressão de *ezh2* não diferiu nos grupos LIN e MIS daquela constatada no grupo MD. Desacetilases de histonas (HDACs) são enzimas responsáveis pela desacetilação de resíduos amino-terminais de histonas (MINUCCI et al., 2006). Não foram constatadas neste estudo diferenças entre a expressão dos genes *hdac1*, *hdac2* e *hdac3* nos diversos grupos experimentais. Por outro lado, em comparação ao grupo MD, os grupos TB e EST apresentaram menor ($p < 0,05$) expressão de *hdac4*, enquanto a expressão deste gene não diferiu entre os grupos LIN, MIS e MD. Ratos tratados com EST

apresentaram maior ($p < 0,05$) expressão de *hdac6* em relação ao grupo controle MD, ao contrário dos animais dos outros grupos experimentais LIN, TB e MIS em que esta diferença não foi constatada. Não foram observadas diferenças entre a expressão da desacetilase de histona *hdac8* nos diversos grupos experimentais. Em relação à expressão dos genes supressores de tumor *rassfla*, *norela* e *cav1*, também não foram constatadas diferenças entre os grupos experimentais.

Tabela 6. Expressão gênica no fígado dos ratos tratados com maltodextrina (MD), óleo de linhaça (LIN), tributirina (TB), mistura (MIS) de TB com LIN ou lipídios estruturados (EST) e submetidos ao modelo do RH e também de ratos do grupo normal (N).

Mecanismo envolvido	Gene	Grupos				
		MB	LIN	TB	MIS	EST
Desmetilação de histonas	<i>kdm4a</i>	1,13 ± 0,22	1,08 ± 0,37	0,84 ± 0,09	0,93 ± 0,13	0,99 ± 0,09
	<i>kdm6a</i>	0,91 ± 0,08	0,82 ± 0,20	0,96 ± 0,08	0,90 ± 0,04	1,09 ± 0,12
	<i>suv39h1</i>	1,00 ± 0,19	0,92 ± 0,11	1,03 ± 0,13	0,82 ± 0,05	1,01 ± 0,1
Metiltransferase de histonas	<i>suv420h1</i>	0,75 ± 0,09	0,73 ± 0,19	0,80 ± 0,07	0,78 ± 0,13	0,98 ± 0,05
	<i>suv420h2</i>	1,05 ± 0,08	1,19 ± 0,32	0,94 ± 0,08	1,00 ± 0,16	1,03 ± 0,09
Repressão da transcrição	<i>riz1</i>	0,66 ± 0,18	0,58 ± 0,27	0,59 ± 0,20	0,48 ± 0,08	0,77 ± 0,08
	<i>ezh2</i>	1,40 ± 0,38	0,96 ± 0,19	0,71 ± 0,14*	0,98 ± 0,18	0,86 ± 0,22
	<i>hdac1</i>	0,99 ± 0,06	0,89 ± 0,07	0,98 ± 0,1	1,03 ± 0,18	1,03 ± 0,1
Desacetilase de histonas	<i>hdac2</i>	0,78 ± 0,08	0,72 ± 0,08	0,64 ± 0,04	0,67 ± 0,17	0,64 ± 0,08
	<i>hdac3</i>	0,95 ± 0,10	0,83 ± 0,04	1,08 ± 0,19	0,81 ± 0,08	0,97 ± 0,09
	<i>hdac4</i>	0,94 ± 0,12	0,91 ± 0,2	0,78 ± 0,02*	0,81 ± 0,06	0,73 ± 0,04*
	<i>hdac6</i>	0,86 ± 0,07	1,03 ± 0,18	0,89 ± 0,10	1,06 ± 0,20	1,16 ± 0,14*
	<i>hdac8</i>	0,74 ± 0,17	0,80 ± 0,11	1,01 ± 0,11*	0,84 ± 0,06	0,90 ± 0,05
Supressor de tumor	<i>rassf1a</i>	0,73 ± 0,1	0,76 ± 0,05	0,58 ± 0,16	0,59 ± 0,11	0,74 ± 0,18
	<i>nore1a</i>	1,72 ± 0,16	2,71 ± 0,55	1,03 ± 0,15	1,35 ± 0,22	1,61 ± 0,18
	<i>cav1</i>	0,48 ± 0,08	0,43 ± 0,07	0,61 ± 0,16	0,76 ± 0,09	0,33 ± 0,08

Dados expressos como variação em relação ao grupo MD (média ± erro padrão da média); *Diferença em relação ao grupo MD segundo teste ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$. $n=4$.

kdm4a: desmetilase específica de lisina(K) 4; *kdm6a*: desmetilase específica de lisina(K) 6; *suv39h1*: homólogo 1 do supressor de variação 3-9; *suv420h1*: homólogo 1 do supressor de variação 4-20; *suv420h2*: homólogo 2 do supressor de variação 4-20; *riz1*: gene de interação retinoblastoma dedo de Zn; *ezh2*: homólogo 2 do intensificador zeste; *hdac1*: desacetilase de histona 1; *hdac2*: desacetilase de histona 2; *hdac3*: desacetilase de histona 3; *hdac4*: desacetilase de histona 4; *hdac6*: desacetilase de histona 6; *hdac8*: desacetilase de histona 8; *rassf1a*: família 1A do domínio de associação ao RAS; *nore1a*: família 5A do domínio de associação ao RAS; *cav1*: caveolina 1.

6 DISCUSSÃO

Devido às suas propriedades inibitórias da proliferação celular e indutoras da diferenciação e da apoptose, HDACis vem sendo investigados em vários ensaios pré-clínicos e clínicos envolvendo neoplasias, inclusive hepáticas. Observou-se que o triacilglicerol TB, um HDACi pró-fármaco do AB, apresentou atividade quimiopreventiva quando administrado a ratos nas etapas de iniciação/promoção ou somente na promoção inicial de modelo de hepatocarcinogênese (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012).

EST consistem em uma forma eficiente de introdução de ácidos graxos específicos em triacilgliceróis que podem ser úteis no controle de enfermidades (FÁRFAN, et al., 2013). Porém a literatura é escassa a respeito de estudos a respeito da utilização dos EST em modelos de carcinogênese. O único relato na literatura é a respeito da ação inibitória do crescimento do sarcoma de Yohida quando implantados em ratos. Nesse estudo foram obtidos EST a partir de interesterificação de 40% de óleo de peixe (menhaden) com 60% de Captex 300® (triacilglicerol do ácido caprílico) que foram administrados por via parenteral (LING et al., 1991). Embora as perspectivas de uso dos lipídios estruturados sejam variadas, atualmente, uma das principais aplicações é a produção de ingredientes dietéticos para alimentos com reduzido valor calórico, já que há grande demanda por este tipo de produto como consequência da epidemia global de obesidade. Assim, Olestra® (Procter and Gambler, EUA), Caprenin® (Procter and Gambler, EUA), Salatrim® (Nabisco, EUA) e Óleo de diacilglicerol (Kao, Japão) são exemplos de constituintes de alimentos com reduzido conteúdo energético ou que são utilizados para frituras (LEE, TANG, LAI, 2012). Outra importante aplicação dos

lipídios estruturados é na nutrição parenteral. Ácidos graxos de cadeia média (AGM) são metabolizados mais rapidamente do que os de cadeia longa (AGL). Porém, emulsões lipídicas de AGM não apresentam ácidos graxos essenciais, que são AGL. Assim, estes 2 tipos de ácidos graxos devem ser administrados em conjunto. Entretanto, a mistura simples de AGM e AGL envolve a biodisponibilidade de 2 diferentes lipídios e há evidências a respeito de interações e interferências no metabolismo destes compostos, como a hidrólise preferencial de AGM e inibição da β -oxidação de AGL (ULRICH et al., 1996). Esse problema é contornado com a administração de lipídios estruturados com AGL na sn-2 e AGM na sn-1,3 (STEIN, 1999).

Recentemente foi descrita a interesterificação enzimática do óleo de perila com óleo de milho para obtenção de EST com elevada concentração de ALA (MITRA et al., 2012) e a interesterificação enzimática de LIN com tricaprilina, para a obtenção de triacilgliceróis com ácidos graxos de cadeia média e longa (KHODADADI, KERMASHA, 2014). Assim, no presente estudo, a partir de uma mistura de LIN e TB sintetizou-se enzimaticamente EST que em sua maior parte apresentavam duas moléculas de AB e uma de AAL ou oléico, visando-se a obtenção de triacilgliceróis com potencial anticarcinogênico.

Nesse sentido, relata-se a ocorrência de efeitos anticâncer por parte do AAL (KIM et al., 2014). Este ácido graxo reduziu a expressão de COX-2 (ciclo-oxigenase 2) e induziu a apoptose em células HepG2 (SUNG et al., 2004). Em outro trabalho, ratos ACI-T que receberam implantes de células de hepatoma de Morris e que foram tratados com uma dieta com 10% de ALA durante 28 dias apresentaram maior indução da apoptose e redução da expressão da ácido graxo sintase, quando comparadas aos controles (VECCHINI et al 2004). Da mesma forma, descreveu-se, recentemente, que

uma estreita adesão à dieta do Mediterrâneo, que apresenta elevada relação de lipídios monoinsaturados para saturados, resulta em proteção contra o HCC (TURATI et al., 2014).

No presente estudo TB e EST tiveram efeitos inibitórios em LPN hepáticas produzidas pelo modelo do RH o que sugere uma ação quimiopreventiva por parte destes lipídios. Modelos de carcinogênese, em especial, o do RH, estão baseados no conceito de fenótipo resistente. Assim, nódulos hepáticos, considerados uma população precursora do HCC, apresentam alterações bioquímicas que são compatíveis com o conceito de que células neoplásicas apresentam fenótipo resistente, não respondendo ao estímulo citotóxico ou mito inibitório de diversos compostos (YUSUF et al., 1999). Um desses compostos é o 2-AAF, que não inibe a proliferação celular de hepatócitos iniciados, já que estes apresentam redução na atividade das enzimas de detoxificação, responsáveis pela ativação metabólica de xenobióticos em compostos mais polares pela via do sistema citocromo P450 (fase I). Ocorre também aumento na atividade de enzimas envolvidas com a conjugação e excreção de moléculas de origem exógena, ou de seus metabólitos (fase II). Assim, em células iniciadas, o 2-AAF não forma adutos de DNA com consequente bloqueio da atividade da DNA polimerase (VAN GOETHEM et al., 1993; FARBER, 1995). Isso leva a proliferação de células resistentes, de forma sincronizada, com formação de focos e nódulos de hepatócitos, em 1 ou 2 semanas após a última dose de 2-AAF. A grande maioria dessas lesões remodela ao fenótipo “normal” (rLPN) em um processo complexo, que pode levar a alterações no suprimento sanguíneo, metabolismo e arquitetura celulares (TATEMATSU et al., 1983; FARBER, RUBIN, 1991; IMAI et al., 1997). Por outro lado, as lesões persistentes (pLPN) atuam como sítios de futura evolução para o HCC. O valor translacional do modelo do RH foi

demonstrado, uma vez que a expressão de KRT-19 de ratos (provável marcador para stem cells hepáticas) pode prever com sucesso a evolução do HCC em humanos (ANDERSEN et al., 2010; PETRELLI et al., 2013).

O tratamento com LIN e com MIS não resultou em atividade quimiopreventiva. A ausência de quimioprevenção por parte da LIN pode estar relacionada com a dose aqui fornecida de óleo de linhaça. Trabalhos que demonstraram atividade anticâncer do ALA, assim como efeitos quimiopreventivos de afecções cardiovasculares conduzidos em ratos Wistar utilizaram rações com 4 a 10% de LIN (KIM et al. 2014), equivalente a 1,2 à 3 g /100g p.c. No presente estudo, ratos receberam 133 mg/100g de p.c., suficiente para que o fígado desses animais apresentassem concentrações significativas de ALA. Os animais tratados com MIS também apresentaram concentrações significativas de ALA, assim como de AB, porém sem repercussões na quimioprevenção da hepatocarcinogênese.

Confirmando investigações prévias (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012) tanto a TB como os EST reduziram o número e o tamanho das pLPN, o que sugere por parte destes compostos ação supressora e bloqueadora da carcinogênese (WATTENBERG, 1985; ONG et al., 2012). Porém, observa-se que a TB apresenta expressiva ação pró-apoptótica em rLPN (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012), ao contrário do observado após administração dos EST. Portanto, tais atividades inibitórias indicam que a TB e os EST apresentam mecanismos distintos de quimioprevenção, fato que torna-se mais evidente quando observa-se as concentrações hepáticas de AB. Nesse sentido, o grupo EST apresentou atividade quimiopreventiva com menores concentrações hepáticas de AB quando comparado ao grupo TB. Estudo prévio demonstrou que ratos tratados com TB na dose de 100 mg/

100 g de p.c, metade da utilizada no presente trabalho, apresentaram atividade quimiopreventiva na fase de promoção da hepatocarcinogênese experimental (GUARIENTO et al., 2014). Naquele estudo, as concentrações hepáticas de AB nos animais tratados com TB foram 5.1 maiores quando comparadas aos ratos do grupo controle (GUARIENTO et al., 2014). Aqui, o grupo TB apresentou o triplo das concentrações hepáticas de AB quando comparado ao grupo MD enquanto, no grupo EST, as concentrações desse ácido graxo foram o dobro das encontradas no fígado dos animais do grupo controle.

O ácido butírico, presente em concentrações significativas no fígado dos ratos tratados com TB e EST, pode estar envolvido no processo de modificações epigenéticas de histonas. Isso pode ocorrer devido ao efeito Warburg, quando a principal fonte de energia em neoplasias é a glicose (VANDER HEIDEN, CANTLEY, THOMPSON, 2009). Esta alteração metabólica modifica a disponibilidade de acetil-CoA, que é um co-fator essencial para enzimas acetiladoras de histonas que regulam epigeneticamente a expressão gênica (DONOHOE et al., 2012). Assim, talvez, ao invés do AB fornecido pela TB e pelos EST ser convertido em acetil-CoA e utilizado como substrato energético pelos hepatócitos iniciados, este poderá adentrar no núcleo destas células e resultar na modulação da expressão de diversos genes regulados pela inibição de enzimas deacetiladoras de histonas (GANAPATHY, THANGARAJU, PRASAD, 2009).

Demonstrou-se previamente que a TB aumentou a acetilação de H3K9, H3K18 e H4K16, o que indicou sua atividade como um HDACi na hepatocarcinogênese (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012). Embora os padrões de acetilação de histonas por parte da TB e dos EST tenham diferido, os de metilação

foram semelhantes no presente estudo. Assim, a administração de TB resultou aqui não só em aumento dos níveis de H3K9ac e H3K27ac indicando novamente sua ação como um HDACi, bem como dos níveis de H3K9me3 e de H3K27me3. Por outro lado, tratamento com EST não aumentou a acetilação de H3K9 e H3K27, mas sim os níveis de H3K9me3 e de H3K27me3. Resíduos de lisina em histonas como H3K9 e H3K27 consistem, assim, em sítios favoráveis de acetilação e metilação, o que favorece o recrutamento de proteínas efetoras que modificam a cromatina, ativando ou reprimindo, respectivamente, a transcrição gênica (HAKE, XIAO, ALLIS, 2004), inclusive no HCC (POGRIBNY et al., 2014). Constatou-se em animais tratados com TB e com EST redução da expressão de *ezh2*, responsável pela metilação dos resíduos 4, 9 e 27 de lisina da histona H3. Evidências indicam que EZH2 está hiperexpresso em neoplasias sólidas agressivas, inclusive no HCC (CHEN et al., 2007; CAI et al., 2011; WANG et al., 2014). Sua supressão em células de HCC reduziu significativamente a taxa de crescimento das mesmas *in vitro*, diminuindo, ainda, sua tumorigenicidade *in vivo*. Assim, sugeriu-se que EZH2 poderia consistir em um alvo terapêutico (CHEN et al., 2007). O fato de que TB e EST apresentaram atividade quimiopreventiva neste estudo inibindo ainda a expressão de *Ezh2* está de acordo com tal sugestão.

Desacetilases de histonas estão envolvidas com a remoção de um grupamento acetil de resíduos de lisina de proteínas alvo e desempenham múltiplos papéis na coordenação da interação de vias intracelulares de sinalização envolvidas com a remodelação da cromatina. Vários trabalhos demonstraram expressão elevada de HDAC1, HDAC2 e HDAC3 no HCC e que se correlacionava com características clinicopatológicas e recorrência do mesmo (POGRIBNY et al., 2014). Neste estudo, não foram constatadas diferenças entre a expressão gênica de *Hdac1*, *Hdac2* e *Hdac3* dos

diferentes grupos experimentais. Por outro lado, observou-se que o tratamento com TB e EST reduziu a expressão de *Hdac4*. Este efeito pode estar em parte relacionado à presença de AB nas moléculas destes lipídios. Assim, descreveu-se recentemente que o butirato de sódio inibiu os níveis protéicos de HDAC4 em células HepG2 e SMMC-7721 de HCC (WANG et al., 2013), sugerindo-se que este poderia consistir em um dos mecanismos envolvidos com os efeitos anti-carcinogênicos do butirato de sódio como um HDACi.

Descreve-se, por outro lado, que a HDAC6 apresenta resistência ao inibidor butirato de sódio uma vez que contém dois domínios catalíticos espaçados, um deles não funcional e que lhe confere esta característica (GUARDIOLA et al., 2002). Isto pode explicar a observação neste estudo de que em ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com TB, triacilglicerol exclusivamente constituído de três ácidos graxos butíricos, a expressão de *Hdac6* não diferiu daquela constatada no grupo controle MD. Mecanismos diferentes dessa eventual inibição da expressão de *Hdac6* por parte do ácido butírico presente na TB devem estar ocorrendo em animais tratados agora com os EST, uma vez que se constatou aumento significativo da expressão de *Hdac6* somente nos mesmos (grupo EST) em comparação aos controles. A HDAC6 se caracteriza por desempenhar um importante papel na depuração de proteínas deformadas por meio da autofagia. No câncer, esta vem sendo considerada um alvo para o desenvolvimento de fármacos, devido a seu papel na transformação neoplásica. Demonstrou-se em pacientes com HCC que a expressão de HDAC6 encontrava-se reduzida e associada a um pior prognóstico (JUNG et al., 2012). Além disso, hiperexpressão ectópica de HDAC6 suprimiu a proliferação e o crescimento de células neoplásicas hepáticas, aumentou a conversão de LC3B-II e a formação de vacúolos autofágicos, sem causar, entretanto,

morte celular apoptótica ou inibição do ciclo celular. Concluiu-se que a supressão de tumor pela HDAC6 ocorre no câncer hepático devido à ativação de morte celular autofágica independente de caspase pela via JNK/Beclin 1 (JUNG et al., 2012). Os dados do presente estudo estão de certa forma de acordo com tais observações, uma vez que se constatou que animais tratados com EST apresentaram aumento significativo da expressão de *Hdac6*, sem, entretanto, manifestarem alterações na apoptose ou proliferação celular.

Em estudo prévio demonstrou-se que ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com TB também durante a iniciação/seleção apresentaram normalização da via de sinalização de p53 com indução da expressão de genes pró-apoptóticos e consequente aumento da apoptose. Isto foi acompanhado por uma indução de autofagia no fígado dos animais evidenciada por aumento dos níveis hepáticos das proteínas LC3B e BECN1 nos ratos tratados com TB (de CONTI et al., 2013). Desta forma, a atividade quimiopreventiva da hepatocarcinogênese aqui observada após tratamento com EST, mas não com TB, poderia estar relacionada a um aumento da expressão de *Hda6*.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que EST produzidos por interesterificação enzimática a partir da TB e do LIN apresentam atividade quimiopreventiva da hepatocarcinogênese. Importante foi a constatação de que a quimioprevenção após administração de EST se diferenciou daquela previamente demonstrada pelo tratamento com TB por não envolver indução da apoptose e nem acetilação de resíduos de lisina de histona H3, mas sim aumento da expressão gênica de *Hdac6*. Tal efeito por parte dos EST merece ser mais investigado, uma vez que esta desacetilase vem sendo sugerida como alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos e poderia estar relacionada com a autofagia.

8 REFERENCIAS

ABEL, S., *et al.* Changes in essential fatty acid patterns associated with normal liver regeneration and the progression of hepatocyte nodules in rat hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis** 22, 795-804. 2001.

ALTEKRUSE, S.F., *et al.* Geographic variation of intrahepatic cholangiocarcinoma, extrahepatic cholangiocarcinoma, and hepatocellular carcinoma in the United States. **PLoS One** 10, e0120574. 2015.

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

AOCS. **American Oil Chemists Society: AOCS Cj 1-94 DSC Melting properties of fats and oils.** AOCS, Champaign. 2009.

ARAVALLI, R.N.; CRESSMAN, E.N.; STEER, C.J. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. **Arch Toxicol** 87, 227-47. 2013.

ARZUMANYAN, A.; REIS, H.M.; FEITELSON, M.A. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Cancer** 13, 123-35. 2013.

AU, S.L., *et al.* Enhancer of zeste homolog 2 epigenetically silences multiple tumor suppressor microRNAs to promote liver cancer metastasis. **Hepatology** 56, 622-631. 2012.

BANNASCH, P.; ZERBAN, H. Tumor of the liver. *In*: Turusov V.S.; Mohr U. (eds). **Pathology of tumors in laboratory animals.** IARC, Lyon, pp. 199–240. 1990.

BÁRTOVÁ, E., *et al.* Histone modifications and nuclear architecture: a review. **J Histochem Cytochem** 56, 711-21. 2008.

BAUER, J.D.; CAPRA, S. Nutrition intervention improves outcomes in patients with cancer cachexia receiving chemotherapy-a pilot study. **Support Care Cancer** 13, 270-274. 2005.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clin Microbiol Rev** 16, 497-516. 2003.

BIONDO, P.D., *et al.* The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy. **J Nutr Biochem** 19, 787-796. 2008.

- BIRD, A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature** 321, 209-13. 1986.
- BOFFETTA, P.; HASHIBE, M. Alcohol and cancer. **Lancet Oncol** 7, 149-56, 2006.
- BOMMAREDDY, A., *et al.* Effects of dietary flaxseed on intestinal tumorigenesis in Apc(Min) mouse. **Nutr Cancer** 61, 276-283. 2009.
- BOUVARD, V., *et al.* Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. **Lancet Oncol** doi: 10.1016/S1470-2045(15)00444-1. 2015.
- BRADBURY, K.E.; APPLEBY, P.N.; KEY, T.J. Fruit, vegetable, and fiber intake in relation to cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **Am J Clin Nutr** 100, 394S-8S. 2014.
- BRUIX, J., *et al.* Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial. **J Hepatol** 57, 821-9. 2012.
- BURKITT, D.P. Related disease-related cause? **Lancet** 294, 1229-31. 1969.
- CAI, M.Y., *et al.* EZH2 protein: a promising immunomarker for the detection of hepatocellular carcinomas in liver needle biopsies. **Gut** 60, 967-976. 2011
- CALVISI, D.F., *et al.* Disruption of beta-catenin pathway or genomic instability define two distinct categories of liver cancer in transgenic mice. **Gastroenterology** 126, 1374-86. 2004.
- CALVISI, D.F., *et al.* Altered methionine metabolism and global DNA methylation in liver cancer: relationship with genomic instability and prognosis. **Int J Cancer** 121, 2410-20. 2007.
- CASTRO, R.E., *et al.* Identification of microRNAs during rat liver regeneration after partial hepatectomy and modulation by ursodeoxycholic acid. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 299, G887-97. 2010.
- CHAGAS, C.E., *et al.* Folic acid supplementation during early hepatocarcinogenesis: cellular and molecular effects. **Int J Cancer** 129, 2073-2082. 2011.
- CHAPPELL, G., *et al.* Genetic and epigenetic changes in fibrosis-associated hepatocarcinogenesis in mice. **Int J Cancer** 134, 2778-88. 2014.
- CHEN, Y., *et al.* Lentivirus-mediated RNA interference targeting enhancer of zeste homolog 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth through down-regulation of stathmin. **Hepatology** 46, 200-8. 2007.

CHONG, H.; VIKIS, H.G.; GUAN, K.L. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. **Cellular Signalling** 15, 463-469. 2003.

CHRISTENSEN, M.S., *et al.* Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure. **Am J Clin Nutr** 61, 56-61. 1995.

CLOOS, P.A., *et al.* Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. **Genes Dev** 22, 1115-1140. 2008.

COKAKLI, M.; *et al.* Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion. **BMC Cancer** 9, 64-5. 2009.

COLUMBANO, A., *et al.* Gadd45beta is induced through a CAR-dependent, TNF-independent pathway in murine liver hyperplasia. **Hepatology** 42, 1118-26. 2005.

CONGDON, L.M. *et al.* The PR-Set7 binding domain of Riz1 is required for the H4K20me1-H3K9me1 trans-tail 'histone code' and Riz1 tumor suppressor function. **Nucleic Acids Res** 42, 3580-9. 2014.

DANIEL, P., *et al.* Pharmacokinetic study of butyric acid administered in vivo as sodium and arginine butyrate salts. **Clin Chim Acta** 181, 255-63. 1989.

DARVESH, A.S.; BISHAYEE, A. Chemopreventive and therapeutic potential of tea polyphenols in hepatocellular cancer. **Nutr Cancer** 65, 329-344. 2013.

DAVIE, J.R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **J Nutr** 133, 2485S-93S. 2003.

De CONTI, A., *et al.* Chemopreventive effects of the dietary histone deacetylase inhibitor tributyrin alone or in combination with vitamin A during the promotion phase of rat hepatocarcinogenesis. **J Nutr Biochem** 23, 860-6. 2012.

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

De CRAENE, B.; BERX, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. **Nat Rev Cancer** 13, 97-110. 2013.

De FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat Res** 591, 8-15. 2005.

DELONGH, H., *et al.* Investigation of the factor in groundnut meal responsible for "turkey X disease". **Biochim Biophys Acta** 65, 548-51. 1962.

DEMARK-WAHNEFRIED, W., *et al.* Flaxseed supplementation (not dietary fat restriction) reduces prostate cancer proliferation rates in men presurgery. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 17, 3577-87. 2008.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J Natl Cancer Inst** 66, 1191-308. 1981.

DONOHUE, D.R., *et al.* The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. **Mol Cell** 48, 612-26. 2012.

EDEN, A., *et al.* Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. **Science** 300, 455. 2003.

EGORIN, M.J., *et al.* Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. **Cancer Chemother Pharmacol** 43, 445-453. 1999.

EL GHISSASSI, F., *et al.* Formation of 1,N6-ethenoadenine and 3,N4-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. **Chem Res Toxicol** 8, 278-83. 1995.

ENGELMAN, J.A., *et al.* Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. **J Biol Chem** 272, 16374-81. 1997.

FARBER, E.; RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. **Cancer Res** 51, 2751-61. 1991.

FARBER E. Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. **Cancer Res** 55, 3759-62. 1995.

FARBER, E.; SARMA, D.S. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Lab Invest** 56, 4-22. 1987.

FARFÁN, M. *et al.* The effect of interesterification on the bioavailability of fatty acids in structured lipids. **Food Chem** 139, 571-577. 2013.

FARRELL, G.C., *et al.* Apoptosis in experimental NASH is associated with p53 activation and TRAIL receptor expression. **J Gastroenterol Hepatol** 24, 443-52. 2009.

FEINBERG, A.P.; CUI, H.; OHLSSON, R. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. **Semin Cancer Biol** 12, 389-98. 2002.

FEO F., *et al.* Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. **Biochim Biophys Acta** 1765, 126-47. 2006.

FERLAY, J., *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer** 127, 2893-917. 2010.

FERLAY, J., *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** 136, doi:10.1002/ijc.29210. 2015.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem** 226, 497-509. 1957.

FORNER, A.; LLOVET, J.M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet** 379, 1245-55. 2012.

FORNER, A., *et al.* Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Clin Oncol** 11, doi:10.1038/nrclinonc.2014.

FUXE, J.; KARLSSON, M.C. TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition: a link between cancer and inflammation. **Semin Cancer Biol** 22, 455-61. 2012.

GANAPATHY, V.; THANGARAJU, M.; PRASAD, P.D. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. **Pharmacol Ther** 121, 29-40. 2009.

GEORGE, D.K., *et al.* Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. **Gastroenterology** 114, 311-8. 1998.

GERHAUSER C. Cancer chemoprevention and nutriepigenetics: state of the art and future challenges. **Top Curr Chem** 329, 73-132. 2013.

GINSBURG E., *et al.* Growth inhibition and morphological changes caused by lipophilic acids in mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci** 70, 2457-2461. 1973.

GROSS-STEINMEYER, K.; EATON, D.L. Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B(1). **Toxicology** 299, 69-79. 2012.

GUARDIOLA, A.R.; YAO, T.P. Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. **J Biol Chem** 277, 3350-6. 2002.

GUARIENTO, A.H., *et al.* Transcriptomic responses provide a new mechanistic basis for the chemopreventive effects of folic acid and tributyrin in rat liver carcinogenesis. **Int J Cancer** 135, 7-18. 2014.

GUICHARD, C., *et al.* Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. **Nat Genet** 44, 694-8, 2012.

HAKE, S.B.; XIAO, A.; ALLIS, C.D. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. **Br J Cancer** 90, 761-9. 2004.

HAMID, A.S., *et al.* Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. **Oncol Lett** 5, 1087-92. 2013.

HAMIDI, T.; SINGH, A.K.; CHEN, T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. **Epigenomics** 7, 247-65. 2015.

HAYNES, W.M. **CRC Handbook of Chemistry and Physics** 91st ed, CRC Press, Boca Raton, FL. 2010.

HEDEMAN, H., *et al.* Fat emulsions based on structured lipids (1,3-specific triglycerides): an investigation of the in vivo fate. **Pharm Res** 13, 725-8. 1996.

HEERDT, B.G., *et al.* Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a triglyceride analogue of the short-chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity. **Cancer Res** 59, 1584-1591. 1999.

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

HEIDOR, R. *et al.* The chemopreventive activity of the histone deacetylase inhibitor tributyrin in colon carcinogenesis involves the induction of apoptosis and reduction of DNA damage. **Toxicol Appl Pharmacol** 276, 129-35. 2014.

HERNANDEZ-GEA, V.; *et al.* Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology** 144, 512-27. 2013.

HIRASAWA, Y., *et al.* Methylation status of genes upregulated by demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in hepatocellular carcinoma. **Oncology** 71, 77-85. 2006.

HONG, W.K.; SPORN, M.B. Recent advances in chemoprevention of cancer. **Science** 278, 1073-7. 1997.

HONG, W.K.. General keynote: the impact of cancer chemoprevention. **Gynecol Oncol** 88, S56-8. 2003.

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

HRELIA, S., *et al.* The role of delta-6- and delta-9-desaturase in the fatty acid metabolism of hepatomas with different growth rate. **Biochem Mol Biol Int** 34, 449-55. 1994.

HUAN, M., *et al.* In vivo anti-tumor activity of a new doxorubicin conjugate via α -linolenic acid. **Biosci Biotechnol Biochem** 76, 1577-79. 2012.

HUAN M.L., *et al.* Conjugation with alpha-linolenic acid improves cancer cell uptake and cytotoxicity of doxorubicin. **Bioorg Med Chem Lett** 19, 2579-84. 2009.

HUANG, J.; PLASS, C.; GERHAUSER, C. Cancer chemoprevention by targeting the epigenome. **Curr. Drug Targets** 12, 1925-56. 2011.

IMAI, T., *et al.* Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by in situ hybridization. **Carcinogenesis** 18, 545-51. 1997.

IARC. **International Agency for Research on Cancer/World Health Organization**. IARC PRESS Release no 223, 2013.

ISO. **International Organization for Standardization: International Standard ISO 15884; Milk fat preparation of fatty methyl esters**, ISO, Geneva. 2002.

IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **J Mol Catal B Enzym** 10, 129-140. 2000.

JIANG, Y.H.; BRESSLER, J.; BEAUDET, A.L. Epigenetics and human disease. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 5, 479-510. 2004.

JUNG, K. H., *et al.* Histone deacetylase 6 functions as a tumor suppressor by activating c-Jun NH2-terminal kinase-mediated beclin 1-dependent autophagic cell death in liver cancer. **Hepatology** 56, 644-57. 2012.

KAIMORI, A., *et al.* Histone deacetylase inhibition suppresses the transforming growth factor beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocytes. **Hepatology** 52, 1033-45. 2010.

KANG, S.N., *et al.* Preparation and evaluation of tributyrin emulsion as a potent anti-cancer agent against melanoma. **Drug Deliv** 18, 143-149, 2011.

KHODADADI, M., *et al.* Modeling lipase-catalyzed interesterification of flaxseed oil and tricaprylin for the synthesis of structured lipids. **J Mol Catal B Enzym** 102, 33-40. 2014.

KIM, K.B., *et al.* α -Linolenic acid: nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation. **Food Chem Toxicol** 70, 163-178. 2014.

KINLEN, L.J. Meat and fat consumption and cancer mortality: A study of strict religious orders in Britain. **Lancet** 319, 946-9. 1982.

KOJIRO, M.; ROSKAMS, T. Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. **Semin Liver Dis** 25, 133-42. 2005.

KOPELOVICH, L.; CROWELL, J.A.; FAY, J.R. The epigenome as a target for cancer chemoprevention. **J Natl Cancer Inst** 95, 1747-57. 2003.

KUEFER, R., *et al.* Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. **Br J Cancer** 90, 535-541. 2004.

KUROIWA-TRZMIELINA, J., *et al.* Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug. **Int J Cancer** 124, 2520-7. 2009.

LADEP, N.G., *et al.* Problem of hepatocellular carcinoma in West Africa. **World J Hepatol** 6, 783-92. 2014.

LAFARO, K.J.; DEMIRJIAN, A.N.; PAWLIK, T.M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. **Surg Oncol Clin N Am** 24, 1-17. 2015.

LEDER, A.; LEDER, P. Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in cultured erythroleukemic cells. **Cell** 5, 319-322. 1975.

LEE, Y.Y.; TANG, T.K.; LAI, O.M. Health benefits, enzymatic production, and application of medium- and long-chain triacylglycerol (MLCT) in food industries: a review. **J Food Sci** 77, R137-R144. 2012.

LI, W.Q., *et al.* Index-based dietary patterns and risk of incident hepatocellular carcinoma and mortality from chronic liver disease in a prospective study. **Hepatology**, 60, 588-597. 2014.

LIDE, D.R., ed. **CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005**, <<http://www.hbcnpnetbase.com>>, CRC Press, Boca Raton, FL, 2005.

LIEBER, C.S., *et al.* Model of nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Clin Nutr** 79, 502-9. 2004.

LIN, J., *et al.* Virus-related liver cirrhosis: molecular basis and therapeutic options. **World J Gastroenterol** 20, 6457-69. 2014.

LING, P.R., *et al.* Structured lipid made from fish oil and medium-chain triglycerides alters tumor and host metabolism in Yoshida-sarcoma-bearing rats. **Am J Clin Nutr** 53, 1177-1184. 1991.

LLOVET, J.M.; BRUIX, J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 48, 1312-27. 2008.

LLOVET, J.M., *et al.* Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. **Nat Rev Clin Oncol** 12, 408-24. 2015.

LOUVET, A.; MATHURIN, P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 12, 231-42. 2015.

MA, L., *et al.* Epigenetics in hepatocellular carcinoma: an update and future therapy perspectives. **World J Gastroenterol** 20, 333-45. 2014.

MA, S., *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. **Gastroenterology** 132, 2542-56. 2007.

KHODADADI, M.; KERMASHA, S. Modeling lipase-catalyzed interesterification of flaxseed oil and tricaprylin for the synthesis of structured lipids. **J Mol Catal B Enzym** 102, 33-40. 2014.

MASTRODONATO, M., *et al.* Altered distribution of caveolin-1 in early liver steatosis. **Eur J Clin Invest** 41, 642-51. 2011.

MCKILLOP, I.H.; SCHRUM, L.W. Alcohol and liver cancer. **Alcohol** 35, 195-203. 2005.

MERLO, L.M., *et al.* Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nat Rev Cancer** 6, 924-35. 2006.

MILLER, A.A., *et al.* Clinical pharmacology of sodium butyrate in patients with acute leukemia. **Eur J Cancer Clin Oncol** 23, 1283-7. 1987.

MINUCCI, S.; PELICCI, P.G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nat Rev Cancer** 6, 38-51. 2006.

MITRA, K.; *et al.* Studies of reaction variables for lipase-catalyzed production of alpha-linolenic acid enriched structured lipid and oxidative stability with antioxidants. **J Food Sci** 77, C39-45. 2012.

MORGAN, T.R.; MANDAYAM, S.; JAMAL, M.M. Alcohol and hepatocellular carcinoma.. **Gastroenterology** 127, S87-96. 2004.

MORISHITA, A.; MASAKI, T. miRNA in hepatocellular carcinoma. **Hepatol Res** 45, 128-41. 2015.

MURATA, K., *et al.* Hypoxia-induced des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma. **Int J Oncol** 36, 161-70. 2010.

NAULT, J.C. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma according to aetiology. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 28, 937-47. 2014.

NOUREDDIN, M.; RINELLA, M.E. Nonalcoholic Fatty liver disease, diabetes, obesity, and hepatocellular carcinoma. **Clin Liver Dis** 19, 361-79. 2015.

NOVOGRODSKY, A.; *et al.* Effect of polar organic compounds on leukemic cells. Butyrate-induced partial remission of acute myelogenous leukemia in a child. **Cancer** 51, 9-14. 1983.

OKAMOTO, T., *et al.* Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. **J Bio Chem** 273, 5419-22, 1998.

ONG, T.P., *et al.* Chemoprevention of hepatocarcinogenesis with dietary isoprenic derivatives: cellular and molecular aspects. **Curr Cancer Drug Targets** 12, 1173-90. 2012.

PARANAGUÁ-VEZOZZO, D.C., *et al.* Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. **Ann Hepatol** 13, 386-93. 2014.

PELLICELLI, A.M., *et al.* HCV genotype 1a shows a better virological response to antiviral therapy than HCV genotype 1b. **BMC Gastroenterol** 16, doi: 10.1186/1471-230X-12-162. 2012.

PELTOMÄKI, P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. **Exp Cell Res** 318, 299-310. 2012.

PERRA, A., *et al.* YAP activation is an early event and a potential therapeutic target in liver cancer development. **J Hepatol** 61, 1088-96. 2014.

PETRASEK, J., *et al.* Differences in innate immune signaling between alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis. **J Gastroenterol Hepatol** 28, 93-8. 2013.

PETRELLI, A., *et al.* MicroRNA/gene profiling unveils early molecular changes and nuclear factor erythroid related factor 2 (NRF2) activation in a rat model recapitulating human hepatocellular carcinoma (HCC). **Hepatology** 59, 228-41. 2014.

PICKUP, M.; NOVITSKIY, S.; MOSES, H.L. The roles of TGF β in the tumour microenvironment. **Nat Rev Cancer** 13, 788-99. 2013.

PITOT, H.C. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet** 358, 859-60. 2001.

POGRIBNY, I.P.; RUSYN, I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett** 342, 223-30. 2014.

POGRIBNY, I.P.; RUSYN, I.; BELAND, F.A. Epigenetic aspects of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogenesis: studies in rodents. **Environ Mol Mutagen** 49, 9-15. 2008.

RAJARAM, S. Health benefits of plant-derived α -linolenic acid. **Am J Clin Nutr** 100, 443S-8. 2014.

READ, J.A., *et al.* Nutrition intervention using an eicosapentaenoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. **Support Care Cancer** 15, 301-307. 2007.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nat Rev Immunol** 5, 215-29. 2005.

REPHAELI, A., *et al.* Butyrate-induced differentiation in leukemic myeloid cells in vitro and in vivo studies. **Int J Oncol** 4, 1387-1391. 1994.

RIZZI, M.B., *et al.* Beta-carotene inhibits persistent and stimulates remodeling gamma GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. **Int J Vitam Nutr Res** 67, 415-22. 1997.

ROMERO-CORDOBA, S.L., *et al.* miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. **Cancer Biol Ther** 15, 1444-55. 2014.

SAWAN, C., *et al.* Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutat Res** 642, 1-13. 2008.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc** 3, 1101-8. 2008.

SEGURA, N., *et al.* Valorization of beef tallow by lipase-catalyzed interesterification with high oleic sunflower oil. **J. Am. Oil Chem. Soc** 88, 1945-54. 2011.

SEITZ, H.K.; STICKEL, F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. **Nat Rev Cancer** 7, 599-612. 2007.

SEMPLE-ROBERTS, E., *et al.* Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **Int J Cancer** 40, 643-5. 1987.

SHI, K.Q., *et al.* Hepatocellular carcinoma associated microRNA expression signature: integrated bioinformatics analysis, experimental validation and clinical significance. **Oncotarget** 6, 25093-108. 2015.

SHUKLA, S.; MEERAN, S.M. Epigenetics of cancer stem cells: Pathways and therapeutics. **Biochim Biophys Acta** 1840, 3494-3502. 2014.

SILVA, R.C., *et al.* Continuous enzymatic interesterification of lard and soybean oil blend: effects of different flow rates on physical properties and acyl migration. **J Mol Catal B Enzym** 76, 23-28. 2012.

SIMONS, K.; VAZ, W.L. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. **Annu Rev Biophys Biomol Struct** 33, 269-295. 2004.

SINGH, S. *et al.* Chemopreventive strategies in hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 11, 45-54. 2014.

SLOTKIN, R.K.; FREELING, M.; LISCH, D. Heritable transposon silencing initiated by a naturally occurring transposon inverted duplication. **Nat Genet** 37, 641-4. 2005.

SOLT, D.; FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature** 263, 701 – 703. 1976.

SONG, Z., *et al.* Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery. **Int J Pharm** 471, 312-21. 2014.

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

STARLEY, B.Q.; CALCAGNO, C.J.; HARRISON, S.A. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. **Hepatology** 51, 1820-32. 2010.

STEIN, J. Chemically defined structured lipids: current status and future directions in gastrointestinal diseases. **Int J Colorectal Dis** 14, 79-85. 1999.

STEWARD, W.P.; BROWN, K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. **Br J Cancer** 109, 1-7. 2013.

SU, J., *et al.* Evaluation of tributyrin lipid emulsion with affinity to low-density lipoprotein: pharmacokinetics in adult male Wistar rats and cellular activity on Caco-2 and HepG2 cell lines. **J Pharmacol Exp Ther** 316, 62-70. 2006.

SUBRAMANIAM, D., *et al.* DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. **Front Oncol** 80, doi: 10.3389/fonc.2014.00080. 2014.

SUNG, M., *et al.* Differential effects of dietary fatty acids on the regulation of CYP2E1 and protein kinase C in human hepatoma HepG2 cells. **J Med Food** 7, 197-203. 2004.

SUPIC, G.; JAGODIC, M.; MAGIC, Z. Epigenetics: a new link between nutrition and cancer. **Nutr Cancer** 65, 781-92. 2013.

TATEMATSU, M.; NAGAMINE, Y.; FARBER, E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. **Cancer Res** 43, 5049-58. 1983.

THYGESEN, L.C., *et al.* Effects of sample attrition in a longitudinal study of the association between alcohol intake and all-cause mortality. **Addiction** 103, 1149-59. 2008.

THYGESEN, L.C., *et al.* Cancer incidence among patients with alcohol use disorders--long-term follow-up. **Alcohol Alcohol** 44, 387-91. 2009. Jul-Aug;44(4):387-91.

TORRECILLA, S.; LLOVET, J.M. New molecular therapies for hepatocellular carcinoma. **Clin Res Hepatol Gastroenterol** 39, S80-5. 2015.

TRÉPO, C.; CHAN, H.L.; LOK, A. Hepatitis B virus infection. **Lancet** 384, 2053-63. 2014.

TRYNDYAK, V.P., *et al.* Effect of long-term tamoxifen exposure on genotoxic and epigenetic changes in rat liver: implications for tamoxifen-induced hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis** 27, 1713-20. 2006.

TURATI, F. *et al.* Mediterranean diet and hepatocellular carcinoma **J Hepatol** 60, 606-11. 2014.

ULRICH, H., *et al.* Parenteral use of medium-chain triglycerides: a reappraisal. **Nutrition** 12, 231-238. 1996.

VAN DER WEYDEN, L.; ADAMS, D.J. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta** 1776, 58-85. 2007.

VAN GOETHEM, F., *et al.* Frequency and DNA content of micronuclei in rat parenchymal liver cells during experimental hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis** 14, 2397- 406. 1993.

VANDER HEIDEN, M.G.; CANTLEY, L.C.; THOMPSON, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science** 324, 1029-33. 2009.

VECCHINI A., *et al.* Dietary alpha-linolenic acid reduces COX-2 expression and induces apoptosis of hepatoma cells. **J Lipid Res** 45, 308-16. 2004.

VLAHOV, G. ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy to check 1,3-random, 2-random pattern of fatty acid distribution in olive oil triacylglycerols. **Spectroscopy** 19, 109-17. 2005.

VOGELSTEIN, B., *et al.* Cancer genome landscapes. **Science** 339, 1546-58. 2013.

WANG, H. G., *et al.* Anticancer effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells in vitro. **Int J Mol Med** 31, 967-974. 2013.

WANG, L., *et al.* c-Myc-mediated epigenetic silencing of MicroRNA-101 contributes to dysregulation of multiple pathways in hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 59, 1850-63. 2014.

WARGOVICH, M.J., *et al.* Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. **Carcinogenesis** 21, 1149-55. 2000.

WATKINS, S.M., *et al.* Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumor cells. **J Dairy Res** 66, 559-567. 1999.

WATTENBERG, L.W (1985) Chemoprevention of cancer. **Cancer Res** 45, 1-8. 1985.

WEBSTER, D.P.; KLENERMAN, P.; DUSHEIKO, G.M. Hepatitis C. **Lancet** 385, 1124-35. 2015.

WILLIAMS, D., *et al.* Flax seed oil and flax seed meal reduce the formation of aberrant crypt foci (ACF) in azoxymethane-induced colon cancer in Fisher 344 male rats. **Food Chem Toxicol** 45, 153-9. 2007.

WILSON, N.H.; HARDISTY, J.F.; HAYES, J.R. Short-term, subchronic and chronic toxicology studies. In: Hayes AW, editor. **Principles and methods of toxicology**. New York: Informa Healthcare Inc, 1223-1264. 2008.

WONG, C.M., *et al.* Regulation of hepatocarcinogenesis by microRNAs. **Front Biosci** 5, 49-60. 2013.

WORLD CANCER RESEARCH FOUNDATION/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Patterns of cancer. In **Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention Of Cancer: a Global Perspective**. Washington DC, AICR. 2007.

WU, L., *et al.* Conditional knockout of the mouse NADPH-cytochrome p450 reductase gene. **Genesis** 36, 177-81. 2003.

YU, B., *et al.* Lipid nanoparticles for hepatic delivery of small interfering RNA. **Biomaterials** 33, 5924-34. 2012.

YUSUF, A., *et al.* Development of resistance during the early stages of experimental liver carcinogenesis. **Carcinogenesis** 20, 1641-4. 1999.

ZHANG, C. *et al.* Epigenetic inactivation of the tumor suppressor gene RIZ1 in hepatocellular carcinoma involves both DNA methylation and histone modifications. **J Hepatol** 53, 889-895. 2010.

APENDICE

A

B

C

D

Figura. (A) Esquema experimental para a produção dos lipídios estruturados. (B) Aspecto macroscópico do fígado de ratos submetido ao modelo do “hepatócito resistente” de hepatocarcinogênese. (C) Lesão pré-neoplásica persistente. (D) Lesão pré-neoplásica em remodelação.