EFEITOS DAS ADMINISTRAÇÕES DE β -CAROTENO E VITAMINA A
EM RATOS WISTAR NA ETAPA DE PROGRESSÃO DO MODELO
DE HEPATOCARCINOGENÊSE DO “HEPATÓCITO RESISTENTE”

FERNANDO SALVADOR MORENO

Tese apresentada à Comissão Julgadora do Concurso para
Livre-Docência junto à Área de Nutrição Humana do
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São
Paulo

São Paulo
1999

EFEITOS DAS ADMINISTRAÇÕES DE β -CAROTENO E VITAMINA A
EM RATOS WISTAR NA ETAPA DE PROGRESSÃO DO MODELO
DE HEPATOCARCINOGÊNESE DO "HEPATÓCITO RESISTENTE"

FERNANDO SALVADOR MORENO

Tese apresentada à Comissão Julgadora do
Concurso para Livre-Docência junto à Área de
Nutrição Humana do Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Um Chamado João

Carlos Drummond de Andrade

João era fabulista?
fabuloso?
fábula?
Sertão místico disparando
no exílio da linguagem comum?

Projetava na gravatinha
a quinta face das coisas,
inenarrável narrada?
Um estranho chamado João
para disfarçar, para farçar
o que não ousamos compreender?

Tinha pastos, buritis plantados
no apartamento?
no peito?
Vegetal ele era ou passarinho
sob a robusta ossatura com pinta
de boi risonho?

Era um teatro
e todos os artistas
no mesmo papel,
ciranda multívoca?

João era tudo?
tudo escondido, florindo
como flor é flor, mesmo não semeada?
Mapa com acidentes
deslizando para fora, falando?
Guardava rios no bolso
cada qual com a cor de suas águas?
Sem misturar, sem conflitar?
E de cada gota redigia
nome, curva, fim,
e no destino geral
seu fado era saber
para contar sem desnudar
o que não deve ser desnudado
e por isso se veste de véus novos?

Mágico sem apetrechos,
civilmente mágico, apelador
de precípite prodígios acudindo
a chamado geral?

Embaixador do reino
que há por trás dos reinos,
dos poderes, das
supostas fórmulas
de abracadabra, sésamo?
Reino cerrado
não de muros, chaves, códigos,
mas o reino-reino?

Por que João sorria
se lhe perguntavam
que mistério é esse?
E propondo desenho figurava
menos a resposta que
outra questão ao perguntante?
Tinha parte com... (não sei
o nome) ou de mesmo era
a parte da gente
servindo de ponte
entre o sub e o sobre
que se arcabuzeiam
de antes do princípio,
que se entrelaçam
para melhor guerra,
para maior festa?

Ficamos sem saber o que era João
e se João existiu
de se pegar.

Dedico esta Tese e agradeço

a Deus pela oportunidade concedida de poder observar mais de perto este espetáculo que é a natureza em diversas de Suas manifestações;

*Com Deus existindo, tudo dá esperança:
sempre um milagre é possível, o mundo se resolve.
Mas se não tem Deus, há de a gente perdidos no
vai-vem, e a vida é burra... Tendo Deus, é menos
grave se descuidar um pouquinho, pois, no fim
dá certo. Mas, se não tem Deus, então, a gente
não tem licença de coisa nenhuma!*

(João Guimarães Rosa)

a Lilo e José também pela oportunidade de me abrirem os caminhos sem questionar, sempre dando o apoio necessário para que neles trilhasse;

à Ró pelo amor sempre presente em todas as instâncias;

*Du hast die schönsten Augen
Mädchen, was willst du mehr?...*

(Dostoiévski)

a Manu e Fu pelos ensinamentos e compreensão em relação a momentos em que infelizmente não estive presente;

*- As idéias não são de ninguém - disse.
Com o indicador desenhou no ar uma série
de círculos contínuos, e concluiu: - Andam
voando por aí, como os anjos.*

(Gabriel Garcia Márquez)

*A aspiração à verdade não é outra coisa
senão a expansão da alma e do conteúdo
que por natureza ela contém.*

(Ménon - Platão apud Werner Jaeger. In: *Paideia*, pg. 663)

ao Professor Hélio, querido e respeitado amigo, a quem muito devo em diversos momentos cruciais de minha vida profissional.

Meus Agradecimentos ainda

a Elaine Regina, Margareth, Ton, Silvia Catarina, Cida, Cláudia, Bia, Suzana e Wagner, que participaram diretamente e sempre com alegria da parte experimental desta Tese, e sem a colaboração dos quais esta não teria sido possível;

à Silvânia pela cooperação sempre solícita e gentil em todos os trabalhos que tive oportunidade de utilizar animais da FCF-USP, inclusive nesta Tese;

à minha querida cunhada Maria pelo auxílio para com a digitalização e preparo das Figuras;

às Professoras Malu e Marilene pela colaboração direta para com a linha de pesquisa “Dieta, Nutrição e Câncer” em diversos de seus aspectos, e pelo apoio e amizade durante todos esses anos;

ao Professor Guerra que também sempre estimulou nossas pesquisas, tratando-me como amigo e “abrindo as portas” do Departamento de Patologia da FMVZ-USP;

à Professora Silvia, “grande ser humano” e docente da área de Nutrição, e a quem devo inclusive o estímulo para que procurasse me tornar um Professor efetivo junto à USP;

aos Professores Célia e Júlio pela amizade e pelo fato de sempre termos trabalhado em conjunto pela Nutrição, em um ambiente harmônico, alegre e construtivo;

aos Professores Beatriz, Franco, João, Jorge e Maria Tereza por me terem facilitado as dependências e equipamentos de seus laboratórios, bem como pela atitude amiga e pelas conversas agradáveis e enriquecedoras, tenham sido elas de cunho científico, político ou não;

ao amigo Professor Dirceu, pela orientação em relação às medidas adequadas de proteção a serem tomadas por ocasião da realização de trabalhos que envolvam a utilização de radioisótopos;

a meus orientados, Bia, Ton, Alda, Valzimeire, Elaine Regina, Margareth, Luciana, Roseli, Fabiana, Elaine e Cida, pelo convívio estimulante, ensinamentos e colaboração para com a linha de pesquisa “Dieta, Nutrição e Câncer”, bem como para comigo;

às secretárias Angela, Bel e Mônica, pela competência, dedicação e gentileza com que sempre me auxiliaram nesses vários anos;

aos técnicos de laboratório Sandra, Teresa Cristina e Renato, bem como a Joana e Lurdes, auxiliares de serviços gerais do Departamento, pelo apoio e auxílio com alegria;

a João e à Equipe de Manutenção da FCF-USP, pela solicitude e presteza sempre presentes no atendimento;

à CAPES, CNPq e FAPESP, pelas bolsas e auxílios sem os quais não teria sido possível que se implementasse a linha de pesquisa “Dieta, Nutrição e Câncer”;

aos alunos de graduação e de pós-graduação de uma forma geral, por significarem o motivo maior de minha dedicação junto à Universidade.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1 Câncer	04
2.2 Carcinogênese	05
2.2.1 Proliferação, Apoptose e Diferenciação Celular	06
2.2.2 Agentes capazes de Induzir a Carcinogênese	07
2.2.2.1 Carcinogênese Química	08
2.2.3 Metilação do DNA	10
2.2.4 Proto-oncogenes e Anti-oncogenes	12
2.3 Hepatocarcinogênese	14
2.3.1 Modelos Experimentais de Hepatocarcinogênese Química	16
2.3.2 O Modelo de Hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"	18
2.3.3 Origem Celular do Hepatocarcinoma	20
2.4 A Relação Alimentação—Nutrição—Câncer e sua Importância	21
2.5 Quimioprevenção do Câncer e Anticarcinogênicos dos Alimentos	23
2.6 Carotenóides e β -Caroteno	25
2.6.1 Absorção, Transporte, Metabolismo e Armazenamento do β -Caroteno	27
2.6.2 Propriedades Biológicas do β -Caroteno	31
2.6.3 β -Caroteno e Câncer	32
2.6.3.1 Estudos em Humanos	32
2.6.3.2 Estudos <i>in vitro</i> e em Animais de Experimentação	34
2.6.3.2.1 β -Caroteno e Hepatocarcinogênese Experimental	36
2.6.3.3 Mecanismos de Ação do β -caroteno Envolvidos com a Carcinogênese	38
2.7 Retinóides	40
2.7.1 Absorção, Transporte, Metabolismo e Armazenamento de Retinóides Naturais	41
2.7.2 Propriedades Biológicas dos Retinóides Naturais	44
2.7.3 Retinóides e Câncer	47
2.7.3.1 Estudos em Humanos	47
2.7.3.2 Estudos <i>in vitro</i> e em Animais de Experimentação	50
2.7.3.2.1 Retinóides e Hepatocarcinogênese Experimental	52
2.7.3.3 Mecanismos de Ação dos Retinóides Envolvidos com a Carcinogênese	53
3. OBJETIVOS	57
3.1 Geral	57
3.2 Específicos	57
4. MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 Animais	58
4.2 Delineamento experimental	58
4.3 Verificação da Pureza do β -caroteno e da Vitamina A a Serem Administrados nos Animais	60
4.4 Sacrifício dos Animais	60
4.5 Exame Macroscópico	61
4.6 Exame Microscópico	64

	Pág.
4.6.1 Microscopia de Luz	64
4.6.1.1 Histoquímica Enzimática para Evidenciação da Atividade de γ -glutamyltranspeptidase (γ GT) ..	64
4.6.1.2 Exame Histopatológico Através de Coloração pela Hematoxilina e Eosina	65
4.6.1.3 Exame Imunohistoquímico para a BrDU	65
4.6.1.3.1 Quantificação dos Hepatócitos Marcados com BrDU	66
4.7 Determinação das Concentrações Hepáticas de β -caroteno e retinol	68
4.8 Determinação da Concentração Hepática de DNA	69
4.9 Análise do Padrão de Metilação dos proto-oncogenes <i>c-Ha-ras</i> e <i>c-myc</i> , bem como do Gene que Codifica para a Enzima HMGC _o A Redutase	70
4.9.1 Isolamento do DNA Genômico	70
4.9.2 Digestão do DNA Genômico com Enzimas de Restrição	71
4.9.3 Eletroforese em Gel de Agarose e Transferência para Suporte Sólido	71
4.9.4 Pré-hibridização, Hibridização, Lavagem da Membrana e Autorradiografia	71
4.9.5 Origem das Sondas e suas Marcações	72
4.10 Análise Estatística	73
5. RESULTADOS	74
5.1 Curva Ponderal dos Animais Durante Aplicação do Modelo de Hepatocarcinogênese	74
5.2 Pesos Corpóreos ao Início e Final do Tratamento, Bem como Pesos dos Fígados por Ocasão do Sacrifício	76
5.3 Quantificação das Lesões Nodulares e de Cânceres Observados Macroscopicamente	77
5.4 Quantificação dos Focos e Nódulos de Hepatócitos Marcados Positivamente pela Enzima γ -glutamyltranspeptidase (γ GT)	78
5.5 Exame Histopatológico dos Fígados dos Ratos Através de Coloração pela Hematoxilina e Eosina	79
5.5.1 Observação Geral	79
5.5.2 Observação Específica	80
5.6 Avaliação das Concentrações Hepáticas de β -caroteno e Retinol	82
5.7 Avaliação da Proliferação Celular Hepática	83
5.8 Padrão de Metilação dos proto-oncogenes <i>c-Ha-ras</i> , <i>c-myc</i> , bem como do Gene que Codifica para a Enzima HMGC _o A Redutase	86
6. DISCUSSÃO	96
6.1 Sobre a Quantificação à Macroscopia das Lesões Pré-neoplásicas e Neoplásicas Presentes nos Fígados de Ratos Wistar Submetidos ao Modelo do "Hepatócito Resistente" e Tratados com Óleo de Milho, β -Caroteno ou Vitamina A Durante a Fase de Progressão da Hepatocarcinogênese.....	96
6.2 Sobre a Quantificação à Microscopia das Lesões Pré-Neoplásicas e Neoplásicas Positivas para a γ Gt Presentes nos Fígados De Ratos Wistar Submetidos ao Modelo do "Hepatócito Resistente" e Tratados com Óleo de Milho, β -Caroteno ou Vitamina a Durante a Fase de Progressão da Hepatocarcinogênese.....	103
6.3 Sobre os Aspectos Morfológicos e a Quantificação das Lesões Hepáticas por Ocasão da Realização Do Exame Histopatológico dos Fígados de Ratos Wistar Submetidos ao Modelo do "Hepatócito Resistente" e Tratados com Óleo de Milho, β -caroteno ou Vitamina A Durante a Fase de Progressão da Hepatocarcinogênese.	106

6.5 Sobre a Proliferação Celular no Fígado e Lesões Neoplásicas Hepáticas de Ratos Wistar Submetidos ao Modelo do "hepatócito resistente" e Tratados com Óleo de Milho, β -caroteno ou Vitamina A Durante a Fase de Progressão da Hepatocarcinogênese.	110
6.6 Sobre o Padrão de Metilação dos Proto-oncogenes <i>c-Ha-ras</i> e <i>c-myc</i> , bem como do Gene que Codifica para a Enzima HMGCoA Redutase, do Fígado e de Lesões Hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de Ratos Wistar Submetidos ao Modelo do "hepatócito resistente" e Tratados com Óleo de Milho, β -caroteno ou Vitamina A Durante a Fase de Progressão da Hepatocarcinogênese.....	119
7. CONCLUSÕES	125
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Representação esquemática do modelo experimental	59
FIGURA 2. Aspecto macroscópico de fígado de rato tratado com óleo de milho (a), β -caroteno (b) ou vitamina A (c) por oito semanas consecutivas durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente". Observar a presença de formações nodulares (seta) na superfície, de cor amarelada e com contornos bem definidos	62
Figura 3 a e b. Aspecto macroscópico de fígado de rato tratado com óleo de milho por oito semanas consecutivas durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente". Observar na superfície dos diversos lobos hepáticos, a presença de formações nodulares de coloração amarelada ou esbranquiçada, com volumes desiguais e contornos irregulares e mal delimitados, comprometendo e deformando grosseiramente o órgão	63
Figura 4. Núcleos de hepatócitos corados em marrom (seta) apresentando padrão típico de marcação de BrDU. (Estreptavidina-biotina-peroxidase/Hematoxilina, 560x) ..	67
Figura 5. Curva de peso dos ratos Wistar durante a aplicação do modelo do "hepatócito resistente"	75
Figura 6. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas a e b), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas c, d e e) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas f [nódulo persistente], g e h [cânceres]), β -caroteno (colunas i [nódulo persistente], j e l [cânceres]) ou vitamina A (colunas m [nódulo persistente], n e o [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente", digeridos com a enzima <i>Hpa</i> II e hibridizados com sonda para o proto-oncogene <i>c-Ha-ras</i>	87
Figura 7. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas a e b), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas c, d e e) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas f [nódulo persistente], g e h [cânceres]), β -caroteno (colunas i [nódulo persistente], j e l [cânceres]) ou vitamina A (colunas m [nódulo persistente], n e o [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente", digeridos com a enzima <i>Msp</i> I e hibridizados com sonda para o proto-oncogene <i>c-Ha-ras</i>	87

Figura 8. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, do DNA extraído de amostra de tecido ao redor de lesões hepáticas de rato tratado com vitamina A durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”, digerido por períodos que variaram de 1 a 6 horas com a enzima *Hpa* II ou *Msp* I e hibridizado com sonda para o proto-oncogene *c-Ha-ras*

89

Figura 9. Digitalização de autorradiografia apresentando padrões de fragmentos de restrição, do DNA extraído de nódulo persistente de hepatócitos de rato tratado com β -caroteno durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”, digerido por períodos que variaram de 1 a 6 horas com a enzima *Hpa* II ou *Msp* I e hibridizado com sonda para o proto-oncogene *c-Ha-ras*

89

Figura 10. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas **a** e **b**), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas **c**, **d** e **e**) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas **f** [nódulo persistente], **g** e **h** [cânceres]), β -caroteno (colunas **i** [nódulo persistente], **j** e **l** [cânceres]) ou vitamina A (colunas **m** [nódulo persistente], **n** e **o** [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”, digeridos com a enzima *Hpa* II e hibridizados com sonda para o proto-oncogene *c-myc*

92

Figura 11. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas **a** e **b**), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas **c**, **d** e **e**) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas **f** [nódulo persistente], **g** e **h** [cânceres]), β -caroteno (colunas **i** [nódulo persistente], **j** e **l** [cânceres]) ou vitamina A (colunas **m** [nódulo persistente], **n** e **o** [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”, digeridos com a enzima *Msp* I e hibridizados com sonda para o proto-oncogene *c-myc*

92

Figura 12. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas **a** e **b**), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas **c**, **d** e **e**) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas **f** [nódulo persistente], **g** e **h** [cânceres]), β -caroteno (colunas **i** [nódulo persistente], **j** e **l** [cânceres]) ou vitamina A (colunas **m** [nódulo persistente], **n** e **o** [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”, digeridos com a enzima *Hpa* II e hibridizados com sonda para o gene que codifica para a enzima HMGCoA redutase

94

Figura 13. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas **a** e **b**), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas **c**, **d** e **e**) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas **f** [nódulo persistente], **g** e **h** [cânceres]), β -caroteno (colunas **i** [nódulo persistente], **j** e **l** [cânceres]) ou vitamina A (colunas **m** [nódulo persistente], **n** e **o** [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente", digeridos com a enzima *Msp* I e hibridizados com sonda para o gene que codifica para a enzima HMGC_oA redutase

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Pesos corpóreos e dos fígados de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA), por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.....	76
Tabela 2. Quantificação das lesões nodulares macroscópicas, bem como de cânceres, de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.....	77
Tabela 3. Quantificação dos focos e nódulos pré-neoplásicos (F/N) positivos para a enzima γ GT, de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese	78
Tabela 4. Concentrações hepáticas de β -caroteno e retinol, de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.	82
Tabela 5. Concentrações hepáticas de DNA de animais submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.	84
Tabela 6. Índice de Marcação com a BrDU, de Amostras de Fígado de Ratos Normais (Nenhum Tratamento), Bem Como De Áreas "Normais" Ao Redor Das Lesões, E Das Próprias Lesões, De Animais Submetidos Ao Modelo Do "Hepatócito Resistente" E Tratados Com Óleo De Milho, β -Caroteno Ou Vitamina A Por 8 Semanas Consecutivas, Durante A Fase De Progressão Da Hepatocarcinogênese.....	85

LISTA DE QUADRO

Pág.

Quadro 1. Incidência e descrição das lesões neoplásicas benignas e malignas, bem como de outras lesões hepáticas, de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.....	81
--	----

ABREVIATURAS

2-AAF – 2-acetilaminofluoreno
AP-1 – proteína ativadora 1
ARAT – acil-coenzima A retinol-aciltransferase
BP – benzo[*a*]pireno
BrDU - bromodesoxiuridina
CDK – quinase dependente de ciclina
CRABP – proteína ligadora de ácido retinóico celular
CRBP – proteína ligadora de retinol celular
DEN – dietilnitrosamina
DMBA - dimetilbenzantraceno
DMH - dimetilhidrazina
DMSO – dimetilsulfóxido
EGF – fator de crescimento epidermal
γGT – gama-glutamiltanspeptidase
GST-P – glutathione-S-transferase placentária
HGF – fator de crescimento do hepatócito
HMGCoA – 3-hidroxi-3-metilglutatil coenzima A
4-HPR – 4-hidrofênol retinamida
IGF-1 – fator de crescimento insulina similar 1
LRAT – lecitina-retinol-aciltransferase
3'-MDAB – 3'-metil-4-dimetilaminoazobenzeno
MNNG – *N'*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina
MNU – metilnitrosouréia
4-NQO – 1-óxido de 4-nitroquinolina
ODC – ornitina descarboxilase
PBS – solução salina tamponada com fosfato
PCA – ácido perclórico
PPAR – receptor ativado proliferante de peroxissomos
RAR – receptor para o ácido retinóico
RARE – elemento de resposta ao receptor para o ácido retinóico
RBP – proteína ligadora de retinol
RH – modelo do "hepatócito resistente"
RXR – receptor para o retinóide X
RXRE – elemento de resposta ao receptor para o retinóide X
SAM – *S*-adenosil-*L*-metionina
TNF-α - fator alfa de necrose tumoral
TPA – acetato de tetradecanoilforbol
TTR - transtiretina

RESUMO

EFEITOS DAS ADMINISTRAÇÕES DE β -CAROTENO E VITAMINA A EM RATOS WISTAR NA ETAPA DE PROGRESSÃO DO MODELO DE HEPATOCARCINOGENÊSE DO “HEPATÓCITO RESISTENTE”

Avaliou-se neste estudo os efeitos das administrações de β -caroteno e vitamina A em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, na proliferação celular e na metilação dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, bem como do gene para a enzima HMGC_oA redutase, em ratos Wistar na etapa de progressão da hepatocarcinogênese. Para tanto, submeteu-se os animais ao modelo do “hepatócito resistente” que consiste na aplicação do carcinogênico iniciante dietilnitrosamina (DEN), seguida de administrações de 2-acetilaminofluoreno e de uma hepatectomia parcial, para seleção/promoção. Dez meses após aplicação da DEN administrou-se em três diferentes grupos de ratos β -caroteno (7 mg/100 g de peso corpóreo), vitamina A (1 mg/100 g de peso corpóreo) ou óleo de milho (controles), respectivamente, por intubação gástrica e em dias alternados, durante oito semanas. Ao término desse período os animais foram sacrificados, administrando-se, entretanto, uma hora antes desse procedimento 5-bromo-2-desoxiuridina (BrDU – 10 mg/100 g de peso corpóreo) para avaliação da proliferação celular. Ao exame macroscópico do fígado nessa ocasião, constatou-se que as administrações de β -caroteno e de vitamina A reduziram a incidência de cânceres (25%) em comparação ao grupo controle (62,5%), embora apenas o retinóide tenha reduzido concomitantemente a incidência e o número total de nódulos persistentes de hepatócitos. Estes resultados foram confirmados pelo exame histopatológico (H&E) de cortes de fígado. A morfometria das lesões pré-neoplásicas marcadas pela enzima γ -glutamyltranspeptidase (γ GT) não revelou diferenças significativas entre os grupos. Além disso, as aplicações de β -caroteno e vitamina A reduziram a proliferação celular, tanto nas lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres), como nos tecidos a seus redores. Observou-se, ainda, hipometilação dos genes *c-myc* e para a HMGC_oA redutase em nódulos de hepatócitos e cânceres, que não foi influenciada pelo tratamento com o carotenóide ou o retinóide. A administração de β -caroteno aumentou as concentrações hepáticas do carotenóide, mas não de retinol, o que sugere a existência de uma ação intrínseca do β -caroteno, independente de sua função como pró-vitamina A. Conclui-se ainda que tanto o carotenóide como o retinóide apresentam efeitos inibitórios em lesões neoplásicas quando administrados na etapa de progressão da hepatocarcinogênese. Isto poderia envolver uma inibição da proliferação celular no caso das duas substâncias, mas não alguma ação no processo de metilação do DNA.

1. INTRODUÇÃO

A carcinogênese consiste em um processo prolongado, de múltiplas etapas, e que possibilita, portanto, que sejam tomadas medidas adequadas visando-se evitar, em última instância, a manifestação clínica da doença.

A forma mais adequada de se lidar com qualquer enfermidade é através de sua prevenção, sendo isto especialmente verdadeiro para o câncer. Todavia, um dos grandes problemas na prevenção do mesmo reside no fato de suas causas serem desconhecidas em mais de 50% dos casos (WATTENBERG, 1997). Mesmo sendo estas conhecidas, existem muitas vezes, entretanto, sérias dificuldades para se removê-las.

A medida que não se pode ainda lidar de forma eficaz com as causas do câncer, outras estratégias passam conseqüentemente a merecer maior consideração, como por exemplo a possibilidade de sua quimioprevenção através de micronutrientes ou substâncias não-nutritivas presentes nos alimentos (REDDY, 1996).

Esse conceito de que a doença pode ser prevenida ou postergada por constituintes naturais da alimentação se originou, em parte, graças a inúmeras evidências epidemiológicas que demonstraram no decorrer dos últimos anos a existência de uma associação inversa entre uma maior ingestão de frutas e hortaliças e uma redução no risco para o desenvolvimento do câncer em diversos sítios (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997a).

Tais achados estimularam a realização de pesquisas voltadas para a identificação dos compostos presentes nos alimentos e que seriam responsáveis pela redução desse risco.

Entretanto, por ocasião da avaliação da eventual atividade inibitória de anticarcinogênicos químicos é importante que se procure estabelecer inicialmente, em animais de experimentação, em que etapas do processo carcinogênico estas substâncias estariam atuando predominantemente. Torna-se crítico nesse caso, obviamente, o emprego de modelos experimentais adequados e que propiciem justamente uma distinção e sincronização dessas diversas etapas.

Esse tipo de conhecimento, bem como o esclarecimento dos possíveis mecanismos envolvidos com os efeitos quimiopreventivos dos anticarcinogênicos possibilitam que se estabeleça as bases teóricas para suas posteriores utilizações no ser humano, de forma isolada ou, inclusive, até conjuntamente (DRAGSTED *et al.*, 1993).

Nos últimos anos teve-se a oportunidade de avaliar em nosso grupo de pesquisa, a atividade quimiopreventiva do β -caroteno e da vitamina A em ratos submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" (RH), um dos poucos protocolos de hepatocarcinogênese já descritos na literatura (WU e MORENO, 1998) capaz de produzir lesões pré-neoplásicas (*focos* e *nódulos*) e neoplásicas de forma sincronizada.

Observou-se, logo de início, que o β -caroteno era capaz de inibir o desenvolvimento de focos e nódulos precoces de hepatócitos quando aplicado durante 8 semanas consecutivas em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH. Esta atividade ocorria predominantemente por ocasião da administração do carotenóide previamente à etapa de iniciação do processo carcinogênico, embora também se pudesse constatar certa inibição quando aplicado na fase de seleção/promoção inicial da hepatocarcinogênese (MORENO *et al.*, 1991).

Uma outra constatação importante desse experimento foi de que esta ação inibitória ocorreu de forma mais intensa quando o β -caroteno foi administrado continuamente durante as 8 semanas consecutivas, do que ao ser simplesmente aplicado antes da iniciação ou durante a etapa de seleção/promoção do processo carcinogênico (MORENO *et al.*, 1991).

A seguir, em um outro estudo procurou-se avaliar em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH, a eventual atividade quimiopreventiva da vitamina A em comparação à do carotenóide, não se tendo constatado ação inibitória digna de nota por parte do retinol, ao contrário do β -caroteno, na prevenção do desenvolvimento de focos e nódulos de hepatócitos, por ocasião de sua administração contínua por 8 semanas consecutivas em período que abrangia concomitantemente as etapas de iniciação e seleção/promoção inicial da hepatocarcinogênese (MORENO *et al.*, 1995a). Isto demonstrou ainda *in vivo*, a existência de uma atividade intrínseca do β -caroteno independente de sua função como pró-vitamina A.

Além disso, como se houvesse também descrito anteriormente na literatura em diferentes modelos experimentais, que carotenóides e retinóides pareciam bloquear o desenvolvimento de eventos neoplásicos atuando principalmente na etapa de promoção da carcinogênese (GERSTER, 1995; LOTAN, 1996), procurou-se avaliar, posteriormente, também em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH, as atividades quimiopreventivas do β -caroteno e da vitamina A quando administrados especificamente durante a fase de promoção inicial da hepatocarcinogênese. Observou-se, neste caso, e mais uma vez, ação inibitória digna de nota no desenvolvimento de focos e nódulos de hepatócitos por parte do carotenóide, mas não do retinóide (RIZZI *et al.*, 1997).

Desta forma, os resultados desses diversos experimentos possibilitaram que se chegasse à conclusão de que o β -caroteno apresenta atividade quimiopreventiva, atuando não só e principalmente na iniciação como agente *bloqueador* da carcinogênese, mas também apresentando atividade como anticarcinogênico *supressor* graças à sua atividade demonstrada na etapa de promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Tais resultados foram confirmados por algumas de nossas investigações subsequentes (DAGLI *et al.*, 1998; FIORIO, 1998; OLIVEIRA, 1998), bem como por outros estudos descritos na literatura e que empregaram, inclusive, diferentes modelos de hepatocarcinogênese e outras linhagens de ratos (SARKAR *et al.*, 1994, 1995a, 1995b; TSUDA *et al.*, 1994; GRADELET *et al.*, 1997, 1998; HE *et al.*, 1997).

Todavia, são escassas as referências a respeito de experimentos descrevendo a ação do β -caroteno quando administrado especificamente durante a etapa de progressão da hepatocarcinogênese.

Da mesma forma, em relação à atividade da vitamina A na hepatocarcinogênese, os relatos além de pouco frequentes são ainda conflitantes, em muito dependendo das condições experimentais empregadas.

Recentemente, tivemos também a oportunidade em nosso grupo de pesquisa, de avaliar o efeito da administração de vitamina A por 8 semanas consecutivas, em ratos Wistar que se encontravam na etapa de progressão do modelo do "hepatócito resistente" (SILVEIRA, 1998). O exame histopatológico do fígado dos animais revelou, nesse caso, menor número de lesões neoplásicas benignas e malignas hepatocitárias no grupo de animais tratado com acetato de retinila do que no respectivo grupo controle, o que sugeriu que a vitamina A apresenta um efeito anticarcinogênico supressor quando aplicada especificamente em fase tardia da hepatocarcinogênese.

Devido à sua significância, seria interessante que se confirmasse os resultados desse experimento.

Portanto, procurou-se no presente estudo avaliar em ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente", os eventuais efeitos inibitórios do β -caroteno e da vitamina A quando administrados por 8 semanas consecutivas, agora durante fase desse modelo considerada propícia ao desenvolvimento de cânceres, ou seja, durante a etapa de progressão da hepatocarcinogênese.

Dentre vários mecanismos já descritos como estando mais diretamente envolvidos com a atividade quimiopreventiva de anticarcinogênicos quando por ocasião da administração durante a etapa de progressão da carcinogênese (KELLOFF *et al.*, 1996), devido às suas estreitas relações com a carcinogênese, decidiu-se também por avaliar concomitantemente nessas condições experimentais as atividades do β -caroteno e da vitamina A na proliferação celular, bem como no padrão de metilação do DNA, mais especificamente dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc* e do gene que codifica para a enzima hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMGCoA redutase), genes estes cujos produtos também se encontram reconhecidamente relacionados de forma mais direta com o processo de proliferação celular.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

É provável que o câncer sempre consistiu em uma doença do ser humano e de animais, sendo conhecido desde a antiguidade. Assim, evidências de câncer foram encontradas em humanos mumificados e em fósseis de ossos de animais, bem como em escritos médicos datando do período do Egito antigo. Hipócrates, por exemplo, descreveu doenças que provavelmente consistiam em cânceres do estômago, reto, mama, útero, pele e de outros sítios (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997b).

Entretanto, as taxas de incidência de cânceres, bem como os padrões de ocorrência de diferentes cânceres, eram desconhecidos até épocas relativamente modernas. Desta forma, documentos médicos do século dezoito até à primeira metade do século vinte sugerem que a incidência de câncer aumentou com a urbanização, apesar de parte deste aumento aparente poder ser atribuída a uma maior sobrevida das populações e a um melhor diagnóstico. Na verdade, registros globais confiáveis foram apenas iniciados na segunda metade deste século, com o estabelecimento de arquivos relativos ao câncer (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997b).

Nesse sentido, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) estimou que em 1996 ocorreram no mundo mais de dez milhões de casos novos, e que 7 milhões de indivíduos morreram de câncer (OMS, 1997). Em homens, os oito cânceres mais comuns em ordem de incidência são hoje em dia o de pulmão, estômago, de cólon e reto, próstata, boca e faringe, fígado, esôfago e de bexiga. Em ordem de mortalidade, os de pulmão e estômago continuam sendo o primeiro e segundo, respectivamente, seguidos pelos cânceres de fígado, cólon e reto, esôfago, boca e faringe, próstata e, a seguir, os linfomas. Já em mulheres, os oito cânceres mais comuns em ordem de incidência são hoje em dia: o de mama, cérvix, cólon e reto, estômago, pulmão, de boca e faringe, ovário e de endométrio. Em ordem de mortalidade, também nas mulheres esta é diferente: os de mama e estômago são seguidos pelos cânceres de pulmão, cólon e reto, cérvix, câncer primário de fígado, de esôfago e de boca e faringe.

Nesse mesmo ano, 1996, os doze cânceres com maior mortalidade no mundo foram os de pulmão, estômago, fígado, cólon e reto, esôfago, mama, boca e faringe, cérvix, próstata, bexiga, ovário e endométrio. Acredita-se que todos estejam relacionados à alimentação, incluindo o de pulmão, e, é claro, com o consumo de cigarros (OMS, 1997).

A predominância de cânceres no mundo economicamente em desenvolvimento contrasta com aquela do já economicamente desenvolvido, embora o câncer de pulmão seja hoje em dia o mais comum em ambos. Assim, países da África, América Latina e Ásia apresentam em comum, taxas relativamente elevadas de cânceres do trato aerodigestivo superior, de estômago, fígado e cérvix, enquanto países da Europa, América do Norte e Australásia têm em comum, taxas relativamente elevadas de cânceres de cólon e reto, mama, próstata e de endométrio (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997b).

Comparada com a América Central, a América do Sul apresenta taxas mais elevadas de cânceres de esôfago, estômago, colorretal, pulmão (homens) e de mama, mas taxas semelhantes de cânceres de pulmão (mulheres) e de próstata. As incidências dos cânceres de esôfago e de estômago na América do Sul são mais elevadas do que aquelas de populações brancas da América do Norte, mas as taxas dos cânceres colorretais, de pulmão, mama e de próstata são baixas. Além disso, uma comparação entre as frequências relativas de 1983 a 1987

dos dez cânceres mais comuns em registros de São Paulo, Brasil, e Cali na Colômbia, demonstra que em homens o câncer de pulmão apresenta uma proporção semelhante nas duas populações, embora os cânceres de estômago e próstata contribuam mais para o câncer em homens em Cali do que em São Paulo. Dentre as mulheres, o câncer cervical responde por 22% de todos os cânceres em Cali, mas apenas por 13% em São Paulo, enquanto o câncer de mama responde por 24% de todos os cânceres em mulheres (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997b).

2.2 Carcinogênese

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

Existem duas amplas classificações das neoplasias (ou neoplasmas), que podem ser *benignas* ou *malignas*. As primeiras se referem a neoplasias que apresentam uma proliferação celular localizada e circunscrita exercendo pressão nos tecidos adjacentes, mas que não ultrapassam suas divisas. Em contraste, neoplasmas malignos ou *cânceres*, têm a capacidade de invadir e se multiplicar em diferentes partes do organismo, inclusive à distância de seus locais de origem (SMUCKLER, 1983).

Assim, a definição de uma pré-neoplasia deve incluir etapas prévias do desenvolvimento de neoplasmas tanto benignos como malignos. Portanto, uma *pré-neoplasia* não é idêntica a um pré-câncer, podendo ser descrita em nível histológico, como populações de células fenotipicamente alteradas e que não apresentam natureza neoplásica óbvia, mas que têm possibilidade de progredir para neoplasmas benignos ou malignos (BANNASCH, 1986).

A maioria das doenças exibe períodos ou fases clínica e biologicamente distintas durante suas patogêneses. Isto é especialmente verdadeiro em relação à neoplasia. Assim, observações epidemiológicas e experimentais indicam que o câncer se desenvolve em múltiplas etapas, o que compreende, frequentemente, grande parte da vida das diferentes espécies (FARBER e CAMERON, 1980; MOOLGAVKAR, 1986; PITOT, 1993).

Desta forma, enquanto há alguma discussão quanto ao número exato das múltiplas fases da carcinogênese tanto em humanos como em outros vertebrados, existem evidências substanciais de que a neoplasia pode se desenvolver em três etapas básicas, denominadas, respectivamente, de *iniciação*, *promoção* e *progressão* (FEARON e VOGELSTEIN, 1990; PITOT, 1993; YOKOTA e SUGIMURA, 1993).

Este conceito implica em que as células malignas se desenvolvem a partir das normais, via populações celulares intermediárias consideradas pré-fases do câncer, ou seja, através de alterações ocorrendo em pré-neoplasias.

Portanto, nosso entendimento inicial quanto aos eventos biológicos que acontecem durante o período de latência da neoplasia, se deve a estudos pioneiros conduzidos por diversos investigadores na década de 40 deste século, estudando a carcinogênese de pele em coelhos e camundongos (ROUS e KIDD, 1941; BERENBLUM e SHUBIK, 1947). Estas investigações demonstraram a existência de ao menos duas etapas distintas da carcinogênese, denominadas de iniciação e promoção.

Já na década seguinte, FOULDS (1954), investigando o desenvolvimento de cânceres mamários em camundongos, utilizou o termo progressão para se referir a todo o processo que compreende a carcinogênese, após ocorrência do evento da iniciação.

Mais recentemente, uma compreensão das características das fases de iniciação e promoção, resultou em um modelo sequencial em três etapas para a carcinogênese, consistindo, respectivamente, da iniciação, promoção e progressão (MOOLGAVKAR, 1986; DRAGAN *et al.*, 1993).

Assim, a etapa de iniciação caracteriza-se por alteração irreversível bioquímica ou molecular, bem como hereditária, da célula, frequentemente acompanhada por "fixação" da mesma por um ciclo de proliferação celular, enquanto a promoção resulta na proliferação clonal, comumente reversível, de alguns grupos dessas células iniciadas. Já algumas características da progressão incluem uma instabilidade progressiva do cariótipo e autonomia aumentada da proliferação celular (FARBER e SARMA, 1987; FARBER e RUBIN, 1991; DRAGAN *et al.*, 1995; PITOT *et al.*, 1996).

2.2.1 Proliferação, Apoptose e Diferenciação Celular

O tamanho normal de um órgão é regulado por um equilíbrio dinâmico entre a divisão e a perda celulares, esta última normalmente através de apoptose. Um desequilíbrio nesses componentes resultará em crescimento do órgão, por hipertrofia e/ou hiperplasia, ou em atrofia. Em geral, não ocorrendo morte do organismo, tanto o aumento da replicação celular como da apoptose ocorrem por um tempo limitado, findo o qual se estabelece uma nova homeostasia, resultando em aumento ou diminuição do tamanho do órgão. Entretanto, esta nova condição é mantida em níveis diferentes daqueles anteriormente presentes no órgão normal. Tal alteração pode afetar a forma com que este responde a agressões adicionais, como por exemplo a exposição a hormônios ou outras substâncias químicas, ou mesmo resultar em risco significativamente maior de desenvolvimento de sequelas como o câncer (FOSTER, 1997).

Indubitavelmente, é axiomático que a *proliferação celular* desempenha um papel importante, e até mesmo crítico, nas diversas etapas da carcinogênese de vários órgãos e tecidos, ou seja, na iniciação, promoção e progressão (TOMATIS, 1993; FARBER, 1995). Nestes casos, a proliferação celular seria importante, por constituir parte integral do processo de conversão de adutos do DNA em uma mutação, por ser um fator capaz de aumentar a frequência de mutações através de indução de erros na replicação do DNA, bem como por reduzir o tempo em que pode ocorrer reparo do DNA e ser também importante fator na determinação da relação dose-resposta para alguns carcinogênicos (DOUGLAS *et al.*, 1988; TOMATIS, 1993).

O aumento da divisão celular (mitogênese) pode ser desencadeado tanto por agentes exógenos, como por exemplo carcinogênicos químicos genotóxicos e até mesmo os promotores da carcinogênese, como por agentes e fatores endógenos, estes incluindo radicais livres de oxigênio produzidos pela respiração, fagocitose e injúria celulares, a despurinização do DNA inerente à sua instabilidade química em solução, e alterações no sistema de reparo do DNA (LOEB, 1989; AMES e GOLD, 1990; AMES *et al.*, 1995).

Entretanto, sabe-se que nem todos os agentes capazes de induzir a proliferação celular estão necessariamente envolvidos com a carcinogênese e que tecidos com taxa mais elevada de proliferação celular, como por exemplo o intestino delgado, não apresentam maior risco de desenvolvimento de câncer (TOMATIS, 1993; FARBER, 1995).

Assim, se a proliferação celular *per se* constitui, na verdade, um fator de risco, é ainda motivo de debates na literatura (FARBER, 1995; CORRESPONDENCE, 1996).

Um outro fator importante no controle do tamanho final de um órgão consiste na morte celular por *apoptose*, algumas vezes também denominada de morte celular programada, ativa ou fisiológica. Esta consiste em um tipo de morte celular distinto morfológica, bioquímica e molecularmente da necrose, e que serve para eliminar células em excesso ou indesejáveis de tecidos embrionários, durante a involução de órgãos e na regressão de neoplasmas. Assim, a apoptose é reconhecida hoje em dia, como um fenômeno de ampla ocorrência em biologia, e que é complementar, mas se opõe à proliferação celular, no sentido de preservar a homeostasia tecidual (BURSCH *et al.*, 1994; UEDA e SHAH, 1994; COLUMBANO, 1995).

Trata-se, na verdade, de um programa geneticamente codificado, e que pode ser modulado por uma série de fatores incluindo os de crescimento, mediadores intracelulares da transdução do sinal e proteínas nucleares que regulam a expressão gênica, a replicação do DNA e o ciclo celular. Estes diversos fatores e vias convergem, provavelmente, em etapas finais comuns, resultando em seu fenótipo característico (FISHER, 1994).

Desta forma, este complexo programa pode também estar potencialmente alterado em células neoplásicas, conferindo às mesmas uma vantagem de sobrevivência. Até o momento não existem, entretanto, evidências diretas quanto a um papel da apoptose na patogenia da carcinogênese, embora proto-oncogenes tais como *bcl-2* e *myc*, bem como anti-oncogenes do tipo *p53*, que regulam a apoptose, tenham sido implicados com a progressão ou regressão, respectivamente, do desenvolvimento de neoplasmas (FISHER, 1994). É então possível que a apoptose resulte na eliminação de células portadoras de genes "cancerosos" e reprima o desenvolvimento de neoplasias, enquanto uma falha nesta poderia culminar na progressão das mesmas. Alternativamente, a apoptose poderia desencadear a progressão de neoplasias, afetando a passagem pelas diversas etapas do ciclo celular (UEDA e SHAH, 1994; HUNTER, 1997).

A *diferenciação* tem também um importante papel na biologia das células e está integralmente envolvida com o controle da proliferação das mesmas. Da mesma forma que a carcinogênese, esta também consiste em um processo que se desenvolve em múltiplas etapas e afeta diversos processos biológicos. Assim, células cancerosas apresentam uma série de alterações na diferenciação, comumente associadas com a expressão aberrante de proto-oncogenes do tipo *c-jun* e *junB* e/ou anti-oncogenes. Por outro lado, evidências indicam que processos dependentes de diferenciação podem mediar a expressão de resistência à carcinogênese e induzir as células cancerosas a reverterem a um estado benigno, sem perda de seus potenciais proliferativos (TZEN *et al.*, 1988; SCOTT, 1997).

2.2.2 Agentes Capazes de Induzir a Carcinogênese

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

Tanto na carcinogênese biológica como genética o agente carcinogênico consiste de Macromoléculas com peso molecular relativamente elevado, o DNA ou RNA, responsáveis por transmissão de informação. Em contrapartida, a carcinogênese por radiação pode ser consequência das ações diretas ou indiretas de fótons de elevada energia ou partículas, sobre o DNA existente. Já no caso da carcinogênese atribuível a muitas substâncias químicas de menor

peso molecular, isto pode ou não envolver a ação direta do composto químico com o DNA celular, ou mesmo seu metabolismo a uma forma ativa, que pode, então, reagir com o DNA, produzindo uma alteração permanente em sua estrutura (PITOT e DRAGAN, 1991).

2.2.2.1 Carcinogênese Química

A história do estudo da carcinogênese química tem seu início praticamente três séculos atrás, quando RAMAZINI *apud* HAZELWOOD (1987) reconheceu, em 1700, que o câncer de mama em freiras poderia ser atribuído ao estilo de vida das mesmas (RAMAZINI, 1940), e quando HILL *apud* HAZELWOOD (1987), em 1761, observou a ocorrência frequente de câncer nasofaríngeo em homens que aspiravam cronicamente tabaco em pó (HILL, 1761). Foi entretanto POTT (1775) *apud* HAZELWOOD (1987) quem descreveu pela primeira vez um exemplo de carcinogênese química, reconhecendo que a incidência aumentada de câncer de escroto em limpadores de chaminé, poderia ser atribuída à exposição frequente da pele à fuligem do carvão.

Apesar da existência de muitas formas de câncer, foi justamente o de pele que recebeu a maior atenção por parte dos experimentalistas da época. Todavia, não foi senão em 1915, após as tentativas de inúmeros investigadores, que YAMAGIWA e ICHIKAWA (1915) *apud* HAZELWOOD (1987) tiveram sucesso em produzir experimentalmente neoplasias de pele, após repetidas aplicações tópicas de alcatrão do carvão em orelhas de coelhos. Subsequentemente, este foi fracionado, identificando-se o 1,2,5,6-dibenzantraceno como sendo o primeiro carcinogênico sintético (KENNAWAY e HEIGER, 1930). Um resumo da história de tais estudos, bem como referências adicionais podem ser encontrados na revisão de GREENWALD e GREENWALD (1983) *apud* HAZELWOOD (1987).

Desde então, a lista de substâncias químicas suspeitas ou comprovadamente carcinogênicas para animais de experimentação e o ser humano, não cessou de aumentar no decorrer deste século. Já em uma revisão publicada em 1949, CONKLIN *apud* HAZELWOOD (1987) listou uma grande variedade de associações entre produtos/processos industriais e o câncer. Além de discutir os respectivos papéis da radiação ionizante e ultravioleta, de agentes biológicos tais como vírus e bactérias, de substâncias inorgânicas como o arsênico, asbestos, cromatos e o berílio, o autor descreve uma impressionante lista de compostos orgânicos incluindo a anilina e corantes azo, estrógenos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, alcatrões, óleos, creosoto e o benzeno, dentre outros.

Entretanto, uma questão intrigante da carcinogênese química na época, era como se correlacionar a diversidade da natureza das inúmeras substâncias químicas e seus respectivos efeitos biológicos, com suas consequências finais, ou seja, o câncer. Este problema foi em parte resolvido graças aos estudos de MILLER e MILLER (1966, 1971), que em face a suas observações propuseram a hipótese de que a maioria dos carcinogênicos químicos deveria ser ativada a intermediários eletrofílicos, isto é, compostos capazes de adquirirem elétrons durante reações químicas, que reagiriam, a seguir, com sítios nucleofílicos-átomos que doam elétrons, como por exemplo, o N-2, N-7 e O-6 da guanina-presentes em componentes celulares, estabelecendo, desta forma, um ponto comum de atuação dos carcinogênicos.

Destas observações surgiu, portanto, o conceito de que existem carcinogênicos *diretos* ou *indiretos* (ou *pró-carcinogênicos*), que devem ser convertidos em carcinogênicos *definitivos*, bem como carcinogênicos *próximos*, ou seja, aqueles intermediários metabólicos entre os pró-carcinogênicos, moléculas estas na verdade ainda inativas, e os

carcinogênicos definitivos, eletrofilicos que em última instância reagem com Macro e micromoléculas presentes na célula (VENITT, 1994).

Exemplos de carcinogênicos diretos, ou seja, aqueles que não parecem requerer qualquer conversão prévia a metabólitos mais reativos e que constituem uma minoria, são as nitrosamidas (alquil nitrosouréia), o bis(cloro) metil éter e a mostarda nitrogenada. Por outro lado, aminas aromáticas do tipo do 2-acetilaminofluoreno e 2-naftilamina, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (como por exemplo o benzopireno), as aflatoxinas, o cloreto de vinila, nitrosaminas e nitro-compostos aromáticos ou heterocíclicos do tipo dos nitrofuranos, constituem pró-carcinogênicos, ativáveis por reações de oxidação principalmente no sistema das monoxigenases do fígado, ou de redução, hidrólise, ou de conjugação (FARBER, 1981; VENITT, 1994; DIPPLE, 1995).

Assim, os compostos eletrofilicos produzidos a partir dos carcinogênicos podem interagir com sítios nucleofilicos presentes em MACromoléculas celulares como o DNA, RNA, proteínas e polissacarídeos, bem como em pequenas moléculas como a glutatona, aminoácidos e nucleotídeos (MAGEE e FARBER, 1962; MILLER e MILLER, 1966; RAJALAKSHMI *et al.*, 1982; PITOT e DRAGAN, 1991).

A capacidade dos carcinogênicos de se ligarem aos ácidos nucleicos foi demonstrada pela primeira vez *in vivo* por MAGEE e FARBER (1962). A partir dessa observação, reconhece-se, hoje em dia, que a maioria deles reage quimicamente com o DNA através da transferência a esse ácido nucleico, de resíduos alquila (nitrosaminas, aflatoxinas, nitrosouréias, mostardas), arilamina (aminas aromáticas, amidas, corantes azo) ou aralquila (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, alcalóides pirrazolidínicos), formando, deste modo, produtos estáveis conhecidos como adutos (VENITT, 1994; DIPPLE, 1995). Estes variam em tamanho e complexidade, podendo formar ligações entre bases adjacentes da mesma cadeia (ligações cruzadas intra-cadeia) ou entre as duas cadeias (ligações cruzadas inter-cadeias) do duplêx do DNA, resultando em substituição, deleção e adição de bases e, consequentemente, em mutações pontuais (VENITT, 1994).

A formação de adutos é característica de substâncias genotóxicas. Portanto, carcinogênicos com essa propriedade são conhecidos como *genotóxicos*, sendo capazes de produzir modificação genética.

Após o insulto causado pelo agente genotóxico, as lesões no genoma celular distribuem-se heterogeneamente, refletindo a capacidade dessas substâncias de se direcionarem a sequências específicas ou regiões do genoma (BOHR *et al.*, 1994). Assim, as evidências sugerem que genes individuais, como o *p53*, que desempenha importante papel na manutenção da integridade do genoma (SUN *et al.*, 1995), são mais sensíveis à lesão genotóxica, dependendo de suas sequências, de sua estrutura física na cromatina e de seu estado quanto à transcrição e replicação.

Exemplos seriam o benzo[a] pireno, que produz tipicamente mutações G→T que afetam nucleotídeos em trechos ricos no dinucleotídeo GC da sequência codificante do gene *p53*, bem como a aflatoxina B1 que produz prevalentemente mutações do tipo transversões G→T na sequência de nucleotídeos do códon 249, mutações estas observadas frequentemente no gene *p53* de carcinomas hepatocelulares humanos, em regiões da Ásia e África (GREENBLATT *et al.*, 1994; COLEMAN e TSONGALIS, 1995).

Em contrapartida, carcinogênicos *não-genotóxicos* do tipo do dietilhexilftalato, do metapirileno, tetracloreto de carbono, bifenilas polibromadas e do grupo de substâncias conhecidas como agentes proliferadores de peroxissomos, como certos agentes hipolipemiantes do tipo do clofibrato, são aqueles capazes de induzir a carcinogênese, sem entretanto resultar em qualquer modificação estrutural observável do DNA (REDDY *et al.*, 1980; DOUGLAS *et al.*, 1988; PITOT e DRAGAN, 1991; FOSTER, 1997).

Assim, carcinogênicos não-geotóxicos podem ser definidos como aqueles compostos que não formam adutos de DNA, não induzem reparo do mesmo e apresentam resultados negativos em testes *in vitro* e *in vivo* de mutagenicidade (MELNICK, 1992). Nestes casos, a carcinogenicidade geralmente se dá em apenas um órgão ou tecido, e frequentemente afeta somente uma das espécies de animais testadas (FOSTER, 1997).

Muitos desses carcinogênicos atuam através de mecanismos *epigenéticos*, alterando, por exemplo, a expressão gênica e aumentando a proliferação celular, seja por mitogênese direta da população celular alvo, ou por citotoxicidade com consequente proliferação regenerativa (COHEN e ELLWEIN, 1990; BARRETT, 1992; FOSTER, 1997).

Entende-se como uma modificação epigenética, qualquer alteração no fenótipo que não resulte de alguma mudança na sequência do DNA (BARRETT, 1987). Esta pode ser estável e herdável, incluindo alterações na metilação do DNA, ativação transcricional, controle da tradução e modificações pós-tradução, que resultam, em última instância, em modificações da expressão gênica (SMUCKLER, 1983; BARRETT, 1987).

Substâncias assim chamadas *promotoras* de neoplasias, que podem tanto aumentar ou mesmo serem necessárias à carcinogênese desencadeada por determinado carcinogênico (DRINKWATER, 1990), e que frequentemente não são mutagênicas, atuam, em geral, através de mecanismos epigenéticos, talvez por uma ação proliferativa celular constante (AMES e GOLD, 1990; FOSTER, 1997), com ou sem mutações cumulativas (AMES e GOLD, 1990; TRAVIS e BELEFANT, 1992), evocando eventos que poderiam inativar alelos de anti-oncogenes (SCRABLE *et al.*, 1990), ou mesmo por interações mediadas entre o promotor e receptores (WEINSTEIN, 1988; PITOT, 1995).

Desta forma, a estimulação da proteína quinase C desencadeada por certos ésteres de forbol, constitui exemplo clássico de promoção epigenética (DRINKWATER, 1990), em contraste com outros promotores que podem inibir fosfatases de proteínas (HAYSTEAD *et al.*, 1989), ou mesmo atuar através de mecanismos ainda obscuros.

2.2.3 Metilação do DNA

Concomitantemente com as quatro principais bases, o DNA da maioria dos organismos contém uma ou mais bases que ocorrem com menor frequência na cadeia do ácido nucléico, sendo a mais comum destas a 5-metilcitosina (5mC). Estima-se que no DNA de vertebrados 3 a 6% das citosinas se encontram metiladas, principalmente na sequência do dinucleotídeo CpG, cuja distribuição na cadeia está longe de ser aleatória, e ocorrendo principalmente nas regiões 5' de diversos genes (ADAMS, 1990).

Esta principal modificação epigenética de bases do DNA de mamíferos, ou seja a metilação da citosina, ocorre graças à atividade de uma enzima específica, a DNA (citosina-C5) metiltransferase (EC 2.1.1.37), que é capaz de transferir grupamentos metila (CH_3) a partir do doador universal S-adenosil-L-metionina (SAM ou Adomet) ao átomo C5 da citosina, com a consequente produção de resíduos 5mC (ADAMS, 1990; MAZIN, 1993).

Trata-se de um processo que se desenvolve por ocasião do ciclo celular tanto durante a síntese do DNA como após a replicação do mesmo, isto é, em duas etapas, com um dos máximos da metilação do DNA coincidindo com a fase S (de síntese do DNA) e o outro com a mitose ou com as fases G2 ("gap" 2) ou G1 ("gap" 1) (MAZIN, 1993).

Este compreende uma modificação específica no DNA, envolvendo, provavelmente, a formação intermediária de uma ligação covalente do mesmo com a enzima. Durante a replicação

do DNA a fita parental retém as bases modificadas, mas a fita filha se encontra, inicialmente, não-metilada. Portanto, o DNA nesta forma, e neste instante, é conhecido como hemimetilado, até que ocorra a transferência dos grupamentos metila para a fita filha. Nesse interim acontecem reações que necessitam da presença de sítios hemimetilados no DNA nascente, tais como reparo de desapareamento, segregação cromossômica e expressão de alguns genes (ADAMS, 1990).

A metilação da citosina resulta em diversas modificações biofísicas no DNA, podendo, por exemplo, aumentar a temperatura de fusão do DNA "nu", influenciar a extrusão de estruturas cruciformes, bem como a transição da forma B para a forma Z do mesmo e, desta maneira, modular a atividade enzimática de alguns dos componentes envolvidos com importantes eventos de manutenção da integridade do genoma de células de mamíferos, tais como a ligação de extremidades, um processo não-homólogo em que quebras do DNA são religadas, e a recombinação homóloga (ZACARIAS, 1993; LIANG e JASIN, 1995).

Além disso, funcionalmente a metilação do DNA desempenha um papel crítico na regulação da transcrição e, portanto, da expressão gênica, tendo sido implicada, por exemplo, tanto com o estabelecimento como com a manutenção da inativação do cromossomo X, bem como com padrões de impressão genômica e com a diferenciação celular (RAZIN e CEDAR, 1991; RAZIN e CEDAR, 1994).

Assim, as consequências da metilação da citosina na regulação gênica podem refletir alterações diretas ou indiretas na capacidade de ligação ou ativação de fatores de transcrição e proteínas da cromatina (ADAMS, 1990; RAZIN e CEDAR, 1991; ZACARIAS, 1993).

Desta forma, numerosos estudos estabeleceram correlações, *in vitro* e *in vivo*, entre um padrão de hipometilação da região promotora de genes virais ou celulares com o respectivo aumento das expressões dos mesmos, da mesma forma que diversos experimentos demonstraram que a metilação pode reprimir a transcrição gênica (DOERFLER, 1983; BIRD, 1992).

Descreve-se, ainda, que alterações no padrão de metilação do DNA podem também desempenhar importantes papéis na carcinogênese, constituindo um de seus primeiros e mais comuns eventos (COUNTS e GOODMAN, 1995).

Portanto, hipometilação geral do genoma e de genes específicos, bem como hipermetilação localizada em determinadas regiões do DNA (ilhas de CpG), constituem achados característicos observados no decorrer do processo carcinogênico, podendo, inclusive, causar alterações significantes na expressão gênica também neste caso (FEINBERG e VOGELSTEIN, 1983a; GAMA-SOZA *et al.*, 1983; JONES, 1987; LAIRD e JAENISCH, 1994).

De fato, descreveu-se que a hipometilação de oncogenes se encontra associada com o aumento de suas expressões, tendo sido ainda observada em algumas sequências repetitivas e genes diretamente relacionados com o desenvolvimento de neoplasmas malignos (COUNTS e GOODMAN, 1995; USHIJIMA *et al.*, 1997).

Nesse sentido, baseando-se na observação da ocorrência de hipometilação de determinado sítio do oncogene *raf* constatada logo nas etapas iniciais da hepatocarcinogênese em camundongos e, posteriormente, de que esta se mantinha também por ocasião do surgimento dos carcinomas, sugeriu-se que a hipometilação poderia constituir um dos fatores cruciais envolvidos com a etapa da promoção, e que facilitaria, eventualmente, a expansão clonal de células progenitoras que resultariam, em última instância, em neoplasias malignas (COUNTS e GOODMAN, 1995).

A hipótese de que a hipometilação do DNA constitui um evento também importante durante a etapa de iniciação do processo carcinogênico, foi reforçada por experimentos realizados com o agente hipometilante 5-azacitidina, tendo-se relatado que este análogo da citidina foi capaz de ativar genes previamente inativos e de potencializar a iniciação da hepatocarcinogênese por agentes químicos (JONES *et al.*, 1982; DENDA *et al.*, 1985).

Por outro lado, a hipermetilação de regiões específicas do DNA poderia estar relacionada com a inativação de anti-oncogenes ou mesmo com uma maior presença de mutações no DNA, inclusive nos próprios anti-oncogenes, em consequência da desaminação da 5mC em uracila e formação de transições C→T. Assim, a hipermetilação regional foi associada, por exemplo, com a inibição da expressão do anti-oncogene retinoblastoma, e com a ocorrência de uma elevada porcentagem de mutações observada nos dinucleotídeos CpG do gene *P53* em casos de câncer colorretal (FEARON e JONES, 1992; MAZIN, 1993; COUNTS e GOODMAN, 1995).

Descreve-se ainda que a hipermetilação poderia também influenciar a carcinogênese, mais especificamente sua etapa de iniciação, através de uma inibição do reparo do DNA com consequente fixação de uma lesão promutagênica (COUNTS e GOODMAN, 1995).

2.2.4 Proto-oncogenes e Anti-oncogenes

As células neoplásicas possuem, tipicamente, numerosas mutações genômicas e aberrações cromossômicas, incluindo mutações pontuais, amplificações e deleções gênicas, bem como erros de replicação. A aquisição de tal instabilidade do genoma pode representar uma etapa inicial no processo da carcinogênese, comprometendo proteínas envolvidas, por exemplo, com a replicação e reparo do DNA, com a progressão pelo ciclo celular, bem como diversos outros componentes do complexo arranjo bioquímico responsável pela manutenção da homeostasia celular normal (COLEMAN e TSONGALIS, 1995).

Assim, acredita-se que o fenótipo maligno se desenvolva em consequência de um acúmulo de mutações em genes que desempenham um papel crítico no controle da divisão, crescimento e diferenciação celular, acúmulo este acompanhado por uma série de alterações histopatológicas, através das quais o epitélio normal progride para a neoplasia benigna e, subsequentemente, para a maligna (FEARON e VOGELSTEIN, 1990; VENITT, 1994).

Um exemplo bem documentado desse processo é o câncer colorretal (FEARON e VOGELSTEIN, 1990), cujo desenvolvimento se acompanha de eventos mutagênicos cumulativos em duas principais classes de genes, os *proto-oncogenes* e os *anti-oncogenes*, que estão intimamente envolvidos com o controle da sinalização célula-célula, com a divisão celular e a apoptose (BARRETT, 1993).

Portanto, cada uma das sucessivas alterações genéticas no processo de carcinogênese conferiria vantagens seletivas de crescimento à população de células afetadas (FEARON e VOGELSTEIN, 1990), sendo que a capacidade proliferativa aumentada das células alteradas estaria associada com uma tendência aumentada de ocorrerem mutações no DNA, o que poderia contribuir para a progressão do fenótipo transformado (COHEN e ELLWEIN, 1990; 1991).

A associação entre proliferação celular e aumento da susceptibilidade à mutação pode refletir a necessidade de replicação do DNA para produzir mutação permanente nos sítios genômicos lesados (COLEMAN e TSONGALIS, 1995). Entretanto, é também possível que algum evento molecular prévio da carcinogênese, torne as células predispostas a mutações no DNA estável (LOEB, 1994).

A existência de uma terceira classe de genes, envolvida com maior predisposição ao câncer, foi postulada face à descoberta de um gene no cromossomo 2, associado a um risco aumentado para o câncer colorretal não-polipósico hereditário (AALTONEN *et al.*, 1993; PELTOMÄKI *et al.*, 1993). Sugeriu-se que este tipo de genes poderia predispor ao câncer os indivíduos afetados, graças a uma instabilidade genética talvez atribuível a alterações de revisão durante a replicação do DNA (AALTONEN *et al.*, 1993).

Desta forma, os genes cujas funções normais ou patológicas podem influenciar as etapas do desenvolvimento neoplásico de uma forma positiva ou negativa, podem ser classificados como proto-oncogenes, anti-oncogenes (ou genes supressores de "tumores", oncogenes recessivos ou ainda emergentes) e genes moduladores, que podem influenciar propriedades importantes mas secundárias de neoplasmas malignos, tais como a invasividade, propriedade de metastatizar ou capacidade de gerar uma resposta imune (KLEIN, 1987).

A descoberta dos oncogenes se relaciona com as pesquisas do início do século quanto a vírus relacionados com o câncer, estimuladas pelos desenvolvimentos na época, da microbiologia e da epidemiologia das doenças infecciosas (VARMUS, 1989).

Os primeiros oncogenes a serem identificados foram aqueles de vírus relacionados com o câncer, sendo portanto denominados de *oncogenes virais* (*v-onc*) (HUEBNER e TODARO, 1969). Logo se descobriu, entretanto, que esse número relativamente pequeno de genes de vírus, estava também representado em células normais de mamíferos. Assim, utilizando sequências de oncogenes virais como sondas gênicas, estudos de hibridização com transferência tipo Southern de DNAs genômicos de células de mamíferos, revelaram a existência de genes correspondentes, denominados de proto-oncogenes celulares (*c-onc*). Além disso, análises de genes *c-onc* e *v-onc* possibilitaram a conclusão de que proto-oncogenes constituíam, na verdade, genes normais, codificantes para proteínas envolvidas com mecanismos celulares de transdução do sinal, empregados na manutenção do crescimento e desenvolvimento da célula normal (BISHOP, 1987; VARMUS, 1989; BISHOP, 1996).

Sabe-se então que oncogenes conhecidos de DNA vírus, constituem partes integrais do genoma viral requerido à replicação dos vírus. Por outro lado, os oncogenes de retrovírus são genes celulares normais ou ligeiramente modificados, que são ou apropriados pela célula hospedeira ou nela ativados (LODISH *et al.*, 1995). De fato, genes *v-onc* devem ter surgido durante a evolução, por integração no genoma viral de uma cópia de um proto-oncogene normal.

Quanto às funções das proteínas codificadas por esses proto-oncogenes envolvidos com a proliferação e desenvolvimento da célula normal ou com sua transformação por agentes físicos, químicos ou virais (BISHOP 1996), estas podem atuar como fatores de crescimento, receptores para fatores de crescimento, transdutores intracelulares do sinal ou como fatores de transcrição (BISHOP, 1991; WALKER e RAPLEY, 1997). Não é surpreendente, portanto, que alguma alteração, ou "ativação", de proto-oncogenes, possa estar relacionada com a carcinogênese.

Análises bioquímicas e de biologia molecular comparativas entre os oncogenes virais e os proto-oncogenes, sugeriram que os últimos devem ter sofrido diversas alterações, incluindo deleções e mutações, por ocasião de seus processos de transdução para os genomas virais. Assim, o potencial carcinogênico do oncogene viral foi atribuído a essas alterações. Estes achados resultaram, inclusive, no conceito de "ativação" de proto-oncogenes celulares como base da carcinogênese não-viral, dando ainda suporte à teoria oncogênica do câncer, proposta por HUEBNER e TODARO (1969).

A ativação de proto-oncogenes no processo neoplásico pode ocorrer ao nível transcricional e resultar em aumento da expressão, podendo ser mediada por: (i) inserção de promotor/estimulador ("mutagênese por inserção"), como por exemplo, em *c-mos*, *c-erbB*, *c-myb*, *c-myc* e *c-Ha-ras*; (ii) translocação, por exemplo em *MYC*, observada no linfoma de Burkitt; (iii) rearranjo gênico, por exemplo *RET* e *TRK*, em carcinomas de tireóide; (iv) amplificação gênica, por exemplo *L-MYC* e *N-MYC*, em tumores sólidos do tipo carcinomas de pulmão, onde esta pode ser constatada como anormalidades cromossômicas, incluindo as assim chamadas "regiões de coloração homogênea", e DNA extracromossômico denominado "minuto duplo"; e finalmente, (v) por mutações pontuais que afetam a estrutura e integridade funcional de seus produtos codificados, como por exemplo em *Ha-RAS*, em carcinomas de cólon, pulmão e pâncreas (BISHOP, 1987; 1991).

Por outro lado, como seus próprios nomes sugerem, os anti-oncogenes estão envolvidos com a inibição da expressão do fenótipo maligno, podendo ser inativados durante o processo da carcinogênese também por mutações pontuais, perda ou deleção cromossômica, recombinação somática ou conversão gênica (VENITT, 1994). Exemplos de anti-oncogenes relacionados com neoplasias humanas, algumas delas inclusive hereditárias por envolverem mutações em células germinativas, são o *RB1*, associado com o retinoblastoma, osteosarcoma e carcinomas de mama, bexiga e pulmão; o *P53*, relacionado com o astrocitoma, osteosarcoma e os carcinomas de mama, cólon e pulmão; o *WT1*, com o tumor de Wilms, e o *DCC*, associado com o carcinoma de cólon (BISHOP, 1991; PONDER, 1992).

Como a patogênese por esses genes se deve à perda de suas funções normais, inferiu-se que estes poderiam servir como repressores de funções bioquímicas e da proliferação celular (SAGER, 1989). Assim, existem evidências circunstanciais de que o produto do anti-oncogene *RB1* pode servir como uma espécie de freio para a passagem das células das etapas G0/G1 do ciclo celular para a fase S, e de que o tipo selvagem do anti-oncogene *p53* ectópico pode inibir a proliferação de células de carcinoma colorretal, cujos genes *P53* são defeituosos (BAKER *et al.*, 1990; HOWE *et al.*, 1990).

Além disso, estudos demonstram que o anti-oncogene *P53*, que se encontra mutado em mais da metade dos cânceres humanos em países ocidentais, está envolvido com o controle da apoptose (YONISH-ROUACH *et al.*, 1991), em resposta a agentes como a radiação ionizante e mutagênicos químicos. Como uma célula morta não pode passar adiante uma mutação, sugere-se que a célula que contém um alelo mutante desse anti-oncogene é mais capaz de sobreviver a um insulto genômico do que uma célula normal, sendo portanto mais provável de resistir a uma mutação no outro alelo do *p53*, devido à sua menor propensão para sofrer apoptose. Mutação em um dos alelos desse anti-oncogene e perda do outro, são frequentemente observadas em células cancerosas (LANE, 1993).

Portanto, células cancerosas acumulam frequentemente modificações genômicas decorrentes de sequência de eventos que podem resultar na ativação cumulativa de arranjos particulares de proto-oncogenes e inativação de anti-oncogenes, com consequentes alterações nos mecanismos normais de controle da proliferação, da apoptose e da diferenciação celular, processos estes também intimamente relacionados com a carcinogênese (SCHMANDT e MILLS, 1993).

2.3 Hepatocarcinogênese

O câncer primário de fígado inclui o carcinoma hepatocelular, responsável por 90% de todos os casos, bem como o angiossarcoma, colangiocarcinoma e o hepatoblastoma, correspondendo no mundo ao sexto câncer mais comum e à terceira causa mais frequente de mortalidade por câncer. Assim, estima-se que em 1996 foram diagnosticados cerca de 540.000 novos casos, correspondendo a 5,2% de todos os casos novos de câncer no mundo. Nesse mesmo ano, estimou-se ainda que a mortalidade atribuível ao câncer primário de fígado foi de 536.000 pessoas, correspondendo a 7,5% de todas as mortes por câncer (OMS, 1997).

As taxas desse câncer são em geral bem mais comuns em sociedades em desenvolvimento, compreendendo mais de 80% dos casos globais e respondendo a China por cerca de mais da metade de todos os casos. É quase sempre fatal, e a incidência em homens é maior do que o dobro do que a de mulheres (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997c).

As infecções pelos vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV) consistem na causa predominante do câncer primário de fígado, que quase sempre se desenvolve em um fígado

cirrótico. Além disso, em fígados não-cirróticos é encontrado em cerca de 20% dos portadores assintomáticos do HBV e raramente em pacientes tomando androgênicos-anabólicos ou esteróides contraceptivos orais (FIEL *et al.*, 1996). Outros fatores de risco incluem o consumo excessivo de bebidas alcoólicas e de cigarros, baixa ingestão de vegetais, ingestão de arsênico inorgânico, exposição ao dióxido de tório radioativo, sobrecarga de ferro e exposição a aflatoxinas (CHEN *et al.*, 1997; KEW *et al.*, 1997; MONTESANO *et al.*, 1997; WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997c).

No Estado do Rio de Janeiro, em período compreendido entre 1979 a 1981, a mortalidade por câncer hepático ocupou o 5º lugar em relação a todos os demais cânceres e foi cerca de 8 vezes mais elevada do que na cidade de São Paulo (PINTO e COLEMAN, 1990), o que confirma a existência de grandes diferenças regionais em relação à mortalidade por este tipo de câncer, também em nosso país.

Estas observações indicam uma etiologia multifatorial para a hepatocarcinogênese humana, que também ocorre através de um processo em múltiplas etapas, envolvendo, provavelmente, interações genéticas e ambientais (CHEN *et al.*, 1997).

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

Isto se deve, em grande parte, à susceptibilidade desse órgão à indução de cânceres, a seu tamanho e grande acúmulo de conhecimentos nos últimos anos em relação à sua biologia, bioquímica, patologia e aspectos moleculares, bem como à facilidade de manipulação de seus diferentes estágios de proliferação celular.

Diversos modelos foram descritos para o estudo da hepatocarcinogênese química. A maior parte utiliza um carcinogênico genotóxico como agente iniciador, tendo sido as nitrosaminas, micotoxinas ou aminas aromáticas, os compostos mais usados. Além disso, em vários protocolos a primeira fase da evolução dos hepatócitos já iniciados é estimulada por breve ou prolongada exposição a um ambiente que selecione estas células para um crescimento diferenciado (promoção) (FARBER e SARMA, 1987; FARBER e RUBIN, 1991).

Os modelos experimentais de hepatocarcinogênese se caracterizam por apresentar antes do surgimento do câncer hepático, proliferações de hepatócitos consideradas ainda pré-neoplásicas, pois não parecem ter algum grau de crescimento autônomo, designadas por *focos* e *nódulos de hepatócitos*, e neoplásicas, respectivamente.

Os focos e nódulos de hepatócitos podem ainda ser denominados de *precoces* e *persistentes*, dependendo do período após aplicação do agente iniciante em que se sacrifica os animais, e que precedem o aparecimento do câncer primário de fígado (FARBER, 1982; BANNASCH e ZERBAN, 1990). Por convenção, denomina-se de focos de hepatócitos às lesões menores do que um lóbulo hepático, enquanto o termo nódulos de hepatócitos é aplicável a lesões geralmente esféricas, ocupando área equivalente a um ou vários lóbulos hepáticos (SQUIRE e LEVITT, 1975).

De acordo com critérios morfológicos e citoquímicos os focos de hepatócitos podem ser classificados em: claros, acidofílicos, vacuolados, intermediários, mistos, basofílicos, tigróides e anofílicos (BANNASCH e ZERBAN, 1990). Estes representariam, com exceção dos tigróides e anofílicos, etapas sucessivas de uma sequência ordenada de alterações celulares, progredindo dos focos apresentando predominantemente células claras ricas em glicogênio ou acidofílicas, para focos de hepatócitos com populações celulares intermediárias mistas e basofílicas, culminando em nódulos (adenomas) e carcinomas hepatocelulares (ZERBAN *et al.*, 1994).

Além disso, estas expansões celulares clonais podem ser distinguidas das células normais aos seus redores, por alterações nas expressões de várias enzimas incluindo a adenosina trifosfatase (ATPase), glicose-6-fosfatase, γ -glutamiltanspeptidase (γ GT) e glutathione-S-transferase placentária (GST-P), que comumente são utilizadas como marcadores para suas identificações, bem como avaliação de seus números e dimensões através de análise de imagem computadorizada (FARBER e SARMA, 1987; DRAGAN e PITOT, 1992; DRAGAN *et al.*, 1997; IMAI *et al.*, 1997).

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

2.3.1 Modelos Experimentais de Hepatocarcinogênese Química

Em 1935, foi descrito o primeiro modelo de carcinogênese hepática em ratos, utilizando-se o carcinogênico o-aminoazotolueno em exposição contínua, por longo período (SASAKI e YOSHIDA, 1935). A ausência de sincronia e a dificuldade de se discernir as diversas etapas da carcinogênese, tornaram-no útil apenas para ensaio da carcinogenicidade de substâncias encontradas por exemplo nos alimentos e em outros meios. Outra desvantagem desse protocolo de hepatocarcinogênese é a geração de nódulos de hepatócitos muitas vezes pequenos.

Já em 1965, descreveu-se um modelo de exposição crônica e intermitente a carcinogênicos, como por exemplo o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), que consiste em se submeter os animais por 3 a 4 semanas a uma ração contendo a substância, interrompendo-se o tratamento por 1 a 3 semanas, e repetindo-se o esquema por mais 3 a 4 vezes (REUBER, 1965). Com este protocolo são gerados nódulos grandes de hepatócitos, muitas vezes utilizados para análises biológicas e bioquímicas. Entretanto, este também não resulta em sincronia no desenvolvimento de neoplasmas malignos.

Um outro modelo de hepatocarcinogênese foi descrito posteriormente, utilizando-se pela primeira vez um carcinogênico iniciador, o 2-AAF, com subsequente aplicação de uma substância promotora, o fenobarbital, o que possibilitou a distinção de duas etapas do processo da carcinogênese (PERAINO *et al.*, 1971). Este foi subsequentemente modificado, substituindo-se o 2-AAF como agente iniciador pela dietilnitrosamina (DEN), aplicada 24 horas após a realização de uma hepatectomia parcial à 70%, capaz de induzir intensa proliferação celular e, provavelmente, de fixar o dano no DNA causado previamente pela DEN (PITOT *et al.*, 1978).

Já o modelo da aflatoxina, descrito em 1973, baseia-se nas propriedades hepatotóxica e hepatocarcinogênica da aflatoxina B1, uma micotoxina produzida pelo fungo *Aspergillus flavus* (NEWBERNE e ROGERS, 1973a; 1973b). Apesar de resultar em 100% de incidência de cânceres, este não possibilita, entretanto, distinção entre as múltiplas etapas do processo carcinogênico.

Em 1946, descreveu-se pela primeira vez a atividade hepatocarcinogênica de uma ração deficiente em colina e metionina (COPELAND e SALMON, 1946). Isto despertou interesse, na época, pois os experimentos envolviam a retirada de uma substância da ração, ao invés da adição de carcinogênicos químicos. Entretanto, questionou-se a validade desse modelo, após a

observação de que as rações poderiam estar, eventualmente, contaminadas com aflatoxina B1 e outros carcinogênicos (NEWBERNE, 1967).

Posteriormente, relatou-se um efeito promotor da hepatocarcinogênese por parte de rações deficientes em colina, quando estas foram administradas por várias semanas após aplicação de carcinogênico iniciador (SELLS *et al.*, 1979). A seguir, três laboratórios independentes descreveram quase que simultaneamente a obtenção de carcinomas hepatocelulares em cerca de 50% dos animais tratados com rações isentas de colina e deficientes em metionina, sem a adição de carcinogênicos (MIKOL, *et al.*, 1983; GHOSHAL e FARBER, 1984a; YOKOYAMA *et al.*, 1985). A esta altura, confirmou-se exaustivamente a não contaminação das rações com aflatoxina ou outros carcinogênicos.

Portanto, esse modelo é capaz não só de promover como também de iniciar o processo da carcinogênese hepática, embora não fiquem também evidentes as múltiplas etapas da hepatocarcinogênese.

A colina consiste em um amônio quaternário presente nos alimentos. Atua como precursor de fosfolípidos e do neurotransmissor acetilcolina, bem como doador de grupamentos metila (após oxidação para betaina). Tentativas no sentido de se esclarecer os mecanismos envolvidos com a gênese do carcinoma hepatocelular, revelaram que a ração deficiente em colina é capaz de produzir alterações no DNA, talvez mediadas por peroxidação lipídica em nível dos núcleos das células (RUSHMORE *et al.*, 1986; MORENO *et al.*, 1990).

Além disso, sua administração crônica pode resultar em deficiência relativa de grupamentos metila no fígado dos animais, com consequente hipometilação do DNA hepático (WILSON *et al.*, 1984). Se esta estiver, por sua vez, associada a um aumento da expressão do proto-oncogene *c-myc*, ou mesmo com mutação do anti-oncogene *p53*, poderia desempenhar um papel na hepatocarcinogênese desencadeada por esse sistema (POIRIER, 1994). Uma outra possibilidade seria o desencadeamento da carcinogênese devido, em parte, a anormalidades presentes na sinalização para proliferação mediada pela proteína quinase C, bem como na apoptose celular (ZEISEL *et al.*, 1995).

A partir de 1980, passou-se a descrever que substâncias não-genotóxicas como a nafenopina, clofibrato e fenofibrato, muitas vezes utilizadas como agentes hipolipemiantes em seres humanos, além de certos analgésicos, uricosúricos e poluentes ambientais como os ftalatos, eram também capazes de desencadear a hepatocarcinogênese em roedores, através da ocorrência de uma série de alterações hepáticas, em especial a proliferação de peroxissomos, com consequente aumento das atividades de algumas enzimas associadas a essas organelas (REDDY *et al.*, 1980; REDDY e RAO, 1987).

Observou-se que estes compostos devem ser administrados por tempo prolongado e que atuam, basicamente, como promotores da carcinogênese hepática, diferindo, ainda, os focos e nódulos de hepatócitos produzidos com esse modelo em suas expressões fenotípicas, daqueles gerados por outros sistemas de hepatocarcinogênese (KRAUPP-GRASL *et al.*, 1990).

Seus mecanismos de ação são ainda desconhecidos, embora se descreva que a atividade promotora do câncer possa estar relacionada neste caso a um aumento de produção de H_2O_2 pelos peroxissomos proliferados, devido a uma indução da β -oxidação de ácidos graxos (REDDY e RAO, 1987), a uma estimulação da proliferação celular via interação com o receptor ativado proliferante de peroxissomos (PPAR) (GREEN e WAHLI, 1994), ou mesmo a uma alteração na expressão de proteínas relacionadas com o ciclo celular (RININGER *et al.*, 1997).

Já no protocolo de hepatocarcinogênese assim chamado "stop model", descrito em 1982, utiliza-se para a indução de carcinomas hepatocelulares e lesões pré-neoplásicas em ratos, o carcinogênico N-nitrosomorfolina dissolvido na água dos animais, e administrado durante sete semanas consecutivas. A seguir, estes são sacrificados em período variável após término do

tratamento, tendo-se descrito a obtenção de carcinomas após cerca de 34 semanas de observação (MOORE *et al.*, 1982).

Também em 1982-1983, descreveu-se um outro modelo, o do ácido orótico (COLUMBANO *et al.*, 1982; RAO *et al.*, 1983). Este se baseia na administração dessa substância adicionada às rações dos ratos durante o período de promoção, após iniciação dos mesmos com o carcinogênico 1,2-dimetilhidrazina (DMH). Descreve-se a obtenção de carcinomas hepatocelulares em 100% dos animais, que manifestaram ainda metástases em 40% dos casos, tratando-se de protocolo que apresenta boa sincronia no desenvolvimento de focos e nódulos de hepatócitos. Um fato ainda relevante é que não se observa nesse modelo, hiperplasia hepática e nem proliferação de células ovais ou de dutos biliares (DENDA *et al.*, 1994).

O ácido orótico consiste em um precursor natural da biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos. Por ocasião de sua administração em excesso, resulta em desequilíbrio do "pool" de nucleotídeos, o que poderia causar alterações na replicação e reparo do DNA, mecanismos estes talvez responsáveis pelo desenvolvimento dos hepatocarcinomas (MANJESHWAR *et al.*, 1993).

2.3.2 O Modelo de Hepatocarcinogênese do "Hepatócito Resistente"

Dentre os vários protocolos de hepatocarcinogênese existentes para ratos, o modelo do "hepatócito resistente" (RH), descrito em 1976 (SOLT e FARBER, 1976) e modificado em 1987 (SEMPLE-ROBERTS *et al.*, 1987), está bem caracterizado e é suficiente para induzir elevada incidência de cânceres.

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

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

Tais hepatócitos resistentes podem ser rapidamente estimulados de modo a formarem proliferações focais (focos e nódulos) após breve exposição não iniciante a reduzidas concentrações de alguns carcinogênicos, tais como o 2-AAF, associada a estímulo mitogênico representado por uma hepatectomia parcial (SOLT e FARBER, 1976; FARBER e SARMA, 1987; FARBER e RUBIN, 1991; LEDDA-COLUMBANO *et al.*, 1992; PITOT *et al.*, 1996).

O 2-AAF, da mesma forma que a grande maioria, se não todos os carcinogênicos genotóxicos, é capaz de inibir a proliferação da maior parte dos hepatócitos normais, ou seja, dos não iniciados (sensíveis), talvez por um bloqueio na atividade da DNA polimerase, devido à formação de adutos de DNA (GOETHEM *et al.*, 1993). Este não é capaz, entretanto, de inibir os poucos hepatócitos resistentes (DRAGAN e PITOT, 1992; FARBER, 1995) que apresentam, caracteristicamente, atividades das enzimas das fases I e II responsáveis pela metabolização de xenobióticos, diminuídas ou aumentadas, respectivamente (ROOMI *et al.*, 1985).

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

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

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

Justamente em nódulos persistentes de hepatócitos é que claramente se conseguiu demonstrar que estes atuam como locais de futura evolução para o câncer. Assim, nódulos persistentes são facilmente observáveis ao redor de sete meses após aplicação do agente iniciante, a DEN.

A carcinogenicidade dessa nitrosamina foi demonstrada pela primeira vez em 1960 (SCHMÄHL *et al.*, 1960), tendo-se constatado, posteriormente, que esta resulta na formação de diferentes tipos de adutos de DNA, tais como a O²-, O⁴-, e O⁶-etilimidina e a 8-hidroxi guanina (DRAGAN *et al.*, 1994a; NAKAE *et al.*, 1997), provavelmente responsáveis pela iniciação do processo carcinogênico. Estes nódulos persistentes demonstram sequência progressiva de evolução celular, com a ocorrência de "nódulos em nódulos" e, finalmente, aparecimento de câncer após cerca de 10-11 meses (FARBER *et al.*, 1988).

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

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

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

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

et al., 1988; FARBER e RUBIN, 1991), podendo estar relacionada com uma maior tendência de evolução para os carcinomas hepatocelulares (OHASHI *et al.*, 1996).

Assim, diversas observações demonstram a existência de uma relação evolutiva entre focos, nódulos e cânceres hepáticos, como por exemplo a presença de associação topográfica entre as várias lesões (FARBER e CAMERON, 1980; WILLIAMS, 1980; SCHERER, 1987; FARBER, 1990; 1992). Além disso, ao contrário do fígado normal, mas de forma semelhante a todos os hepatocarcinomas testados, nódulos hepáticos, na proporção de 1/3, contêm hepatócitos que expressam capacidade de invasão em ensaio *in vitro* (DE RIDDER *et al.*, 1987; FARBER e SARMA, 1987).

2.3.3 Origem Celular do Hepatocarcinoma

Para alguns autores a sequência evolutiva para o câncer hepático, envolvendo a passagem pelas etapas de focos e nódulos, implicaria a desdiferenciação de hepatócitos maduros que reteriam suas capacidades de proliferarem, sem o envolvimento de outros tipos celulares (URIEL, 1976; WILLIAMS, 1980; BANNASCH, 1984; FARBER e SARMA, 1987; PITOT, 1990).

Por outro lado, uma outra hipótese sugere que o processo de iniciação da hepatocarcinogênese ocorreria não no hepatócito maduro diferenciado, que então se desdiferenciaria, mas sim em células "mãe" ("stem cells") ou em suas descendentes imediatas, que originariam neoplasias devido a uma falha em se diferenciarem em células maduras (bloqueio de maturação) (SELL e DUNSFORD, 1989; SELL, 1990; SELL e PIERCE, 1994). Define-se como células "mãe" aquelas células multipotentes que se dividem para produzirem duas outras, sendo que uma permanece como "mãe" e a outra se diferencia e expressa um outro fenótipo. Além disso, caracteristicamente estas respondem através da proliferação à perda celular patológica ou à senescência (SELL, 1990).

Descreve-se que paralelamente aos hepatócitos, um outro grupo de células, o das assim denominadas células "ovais", prolifera em áreas portais do fígado durante a hepatocarcinogênese de ratos, camundongos e seres humanos (OPIE, 1944; PRICE *et al.*, 1952; FARBER, 1956; SELL, 1978; HSIA *et al.*, 1994), bem como em resposta a diferentes outros estímulos. O termo inespecífico células "ovais" foi introduzido pela primeira vez por FARBER, em 1956, embora estas já haviam sido anteriormente descritas na literatura (OPIE, 1944; PRICE *et al.*, 1952).

Células "ovais" apresentam núcleos alongados, citoplasma difuso e aparecem precocemente durante o desenvolvimento de vários protocolos experimentais de hepatocarcinogênese, sendo suas origens ainda obscuras. Investigações apontam os colangioloos como sítio de origem das células "ovais" (GRISHAM e HARTROF, 1961; BANNASCH e REISS, 1971). Já outros estudos sugerem que estas constituíam as próprias células "mãe" (SELL e LEFFERT, 1982; SELL e DUNSFORD, 1989), ou a primeira etapa de diferenciação das mesmas (SIGAL *et al.*, 1992), e que teriam ainda a dupla capacidade de se diferenciarem em células de ductos biliares e em hepatócitos (EVARTS *et al.*, 1987; GERMAIN *et al.*, 1988; TEE *et al.*, 1996).

Desta forma, enquanto alguns autores afirmam que as células "ovais" não desempenham qualquer papel na hepatocarcinogênese (FARBER e CAMERON, 1980; TARSETTI *et al.*, 1993), outros acreditam que a partir destas originar-se-iam focos e nódulos de hepatócitos e, posteriormente, o carcinoma hepatocelular ou o colangiocarcinoma (SELL e DUNSFORD, 1989; SELL, 1990; SELL e PIERCE, 1994).

Entretanto, mais recentemente, demonstrou-se em ratos submetidos ao modelo do RH, que focos e nódulos derivam-se de hepatócitos resistentes e não de células ductulares ovais,

constituindo estas últimas um compartimento facultativo, independente, de células “mãe” multipotenciais (ANILKUMAR *et al.*, 1995). Em concordância com estas observações, estudos utilizando técnicas de biologia molecular, sugerem que tanto os hepatócitos como as células “ovais”, poderiam, na verdade, dar origem a estes dois tipos de carcinomas hepáticos (BRALET *et al.*, 1996; PONDER, 1996; PISTOI e MORELLO, 1996).

2.4 A Relação Alimentação—Nutrição—Câncer e sua Importância

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

Existem relatos de que já YONG-HE YAN, vivendo durante a dinastia Song na China (960-1279 DC), acreditava que uma alimentação deficiente era a causa de uma condição que hoje em dia se acredita ser o câncer de esôfago. Além disso, descreve-se que WISEMAN, em 1676, sugeriu que o câncer poderia ser decorrente de “um erro na alimentação, uma grande acrimônia das carnes e bebidas, associado com uma falha na primeira cocção (digestão)”, recomendando abstenção de “sal e de carnes gordas e temperadas” (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997a).

Posteriormente, LAMBE (1815) *apud* WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, (1997a), alertou em seu tratado a respeito da alimentação, câncer e outras enfermidades crônicas, contra o perigo do consumo em excesso de alimentos em geral, e de carnes em particular.

Já em 1849, BENNETT *apud* WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, (1997a), autor de livros médicos, escreveu que “as circunstâncias que diminuem a obesidade e a tendência de formação de gordura, seriam opostas, *a priori*, àquelas que resultariam em uma tendência ao câncer”.

Por outro lado, no começo deste século SHAW (1907) *apud* WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, (1997a), advogou um regime prudente no sentido de se reduzir o risco de desenvolvimento de cânceres, recomendando maior ingestão de alimentos de origem vegetal e menor consumo de alimentos de origem animal, de bebidas alcoólicas e chá, bem como que se procurasse evitar o tabaco.

Da mesma forma, em 1908 WILLIAMS *apud* WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, (1997a), em seu *Natural History of Cancer*, concluiu que “provavelmente nenhum fator isolado é mais potente na determinação do desencadeamento do câncer em indivíduos predispostos do que a alimentação em excesso”, propondo, ainda, que “muitas indicações apontam para o consumo voraz de proíbidos, especialmente carnes”. De acordo com esse autor “a falta de exercícios e, provavelmente, de alimentos vegetais em quantidades suficientes” estaria relacionada com o câncer.

Quanto aos primeiros estudos epidemiológicos formais que procuraram avaliar a relação alimentação-câncer, pode-se citar aqueles conduzidos por ORR (1933), que desenvolveu um estudo ecológico do câncer oral na Índia, e STOCKS (1933), que realizou uma investigação do câncer tipo caso-controle na Inglaterra e país de Gales; cada um destes identificou distorções nos padrões alimentares como fatores de risco, especialmente a ingestão reduzida de vegetais e frutas (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997a).

Já o fato de que a alimentação pode influenciar a carcinogênese em animais de experimentação foi pela primeira vez observado em experimentos conduzidos por TANNENBAUM (1940; 1942a; 1942b), em que este demonstrou que camundongos submetidos

à restrição alimentar apresentavam menor número de tumores cutâneos espontâneos e/ou induzidos por aplicação via dérmica de benzo[a]pireno, do que animais alimentados *ad libitum*. Além disso, o autor constatou que animais alimentados com rações apresentando elevado conteúdo calórico e/ou ricas em gorduras, tinham maior número de cânceres de mama induzidos por carcinogênicos químicos.

Todavia, um maior interesse pelas causas nutricionais do câncer começou apenas a ocorrer, na verdade, a partir das décadas dos anos 60s e 70s deste século.

Desta forma, durante esse período estudos epidemiológicos investigaram o padrão de incidência na população (PERRY, 1975; DOLL, 1977; WYNDER e GORI, 1977), a distribuição demográfica e socioeconômica, os efeitos da migração (HAENSZEL e KURIHARA, 1968; HAENSZEL *et al.*, 1972; WEISBURGER e RAINERI, 1975; KAGAWA, 1978) e hábitos alimentares em diferentes grupos populacionais (PHILLIPS, 1975), possibilitando que se chegasse à conclusão que fatores nutricionais desempenhavam, efetivamente, importante papel na etiologia e, inclusive, na prevenção de cânceres (COMMITTEE ON DIET, NUTRITION AND CANCER; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1982).

Assim, algumas observações e publicações merecem ainda destaque devido às suas importantes contribuições e repercussões para o maior conhecimento e desenvolvimento do estudo da relação alimentação-nutrição-câncer na época, como por exemplo o fato de se ter constatado elevação das taxas de cânceres de cólon e mama em japoneses migrantes para os EUA, o que reflete a influência do meio ambiente na carcinogênese, incluindo a alimentação (WYNDER e SHIGEMATSU, 1967), e de que a incidência da maioria dos cânceres, se não todos, varia grandemente entre países e regiões. Esta última observação fez, inclusive, com que se concluísse (HIGGINSON e MUIR, 1973; DOLL, 1977) que "80 a 90% dos cânceres se devem a fatores externos, sendo, portanto, teoricamente preveníveis".

Em concordância com essas estimativas WYNDER e GORI (1977) propõe, subsequentemente, em uma revisão, que o "potencial de se prevenir" todos os cânceres seria efetivamente de 80-90%, sugerindo, ainda, que o fator alimentação responderia por 40% de todos os casos de cânceres em homens e 60% em mulheres, e que as causas alimentares do câncer incluiriam, em geral, uma hiperalimentação, bem como gorduras e carnes em excesso.

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

Como fatores protetores esses autores ressaltaram os papéis de vitaminas antioxidantes, de vegetais ricos nesses compostos, e de microconstituintes dos alimentos, como por exemplo, indóis e inibidores de proteases. Fibras, ou alimentos que tornam as fezes volumosas foram também citados como importantes. Além disso, aspectos da alimentação mencionados como possíveis causas de câncer foram o consumo de alimentos em excesso (cânceres de útero e vesícula biliar em mulheres), as gorduras (cânceres de mama, cólon e reto) e carnes (cânceres de cólon e reto). Causas consideradas relativamente sem importância seriam os aditivos alimentares (corantes e adoçantes), contaminantes (excluindo-se a aflatoxina em relação ao câncer hepático) e métodos de preparação e armazenagem capazes de produzirem carcinogênicos. Dez anos mais tarde DOLL (1992) reviu suas conclusões, continuando a afirmar que "a estimativa de que o risco de câncer fatal pode ser reduzido em 35% através de modificações na alimentação, continua a ser razoável".

Desta forma, o COMMITTEE ON DIET, NUTRITION AND CANCER, organizado pelo NATIONAL RESEARCH COUNCIL em 1982, e baseado em resultados de investigações epidemiológicas e experimentais disponíveis até então, propôs recomendações "compatíveis

com uma boa prática nutricional e provavelmente capazes de reduzir o risco de câncer". Estas incluíam a redução da ingestão de gorduras para 30% do total de calorias, a inclusão de frutas, vegetais e cereais integrais na alimentação diária, e a recomendação para se minimizar o consumo de alimentos salgados e defumados, bem como o de bebidas alcoólicas.

Recentemente, os dados epidemiológicos e experimentais acumulados na literatura desde então, relativos à interação alimentação, nutrição e câncer, foram revisados e analisados por inúmeros pesquisadores e consultores de diversos países, o que deu motivo, inclusive, a uma publicação que reflete, sem dúvida, a importância dessa área do conhecimento na atualidade e a que se fizesse, dentre outras, a seguinte recomendação: que se deve reconhecer, inclusive as autoridades governamentais competentes, que a incidência de câncer no mundo pode ser reduzida em 30-40%, através de alterações adequadas na alimentação e em determinados estilos de vida (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997d).

2.5 Quimioprevenção do Câncer e Anticarcinogênicos dos Alimentos

A quimioprevenção do câncer, definida pela primeira vez em 1976 por SPORN e colaboradores, pode ser considerada uma forma de se prevenir a doença, através da administração de um ou mais compostos químicos durante as etapas iniciais pré-neoplásicas da carcinogênese, ou seja, na fase de iniciação ou promoção, e antes do estabelecimento da etapa de progressão (SPORN *et al.*, 1976; WATTENBERG, 1985; ALBERTS e GARCIA, 1995; HONG e SPORN, 1997; PEZZUTO, 1997).

Em primeira instância, o método mais adequado de se eliminar o impacto do câncer em seres humanos é através da prevenção. Nesse sentido, o grupo inicial de medidas visando-se alcançar esse objetivo consiste na remoção dos agentes etiológicos, ou seja, na prevenção primária do câncer (WATTENBERG, 1985; HENDERSON *et al.*, 1991; STATLAND, 1992; AMES *et al.*, 1995; PEZZUTO, 1997).

Em alguns casos isto é possível, como por exemplo, em relação ao fumar. Em outras situações, entretanto, torna-se, muitas vezes um objetivo dificilmente alcançável, como é o caso das lesões do DNA, proteínas e lipídeos, desencadeadas por exposição a produtos oxidantes endógenos decorrentes do metabolismo normal, sugeridos como potenciais agentes causadores de cânceres (AMES, 1983; AMES *et al.*, 1995; SLAGA, 1995). Além disso, vale lembrar que as causas de mais de 50% das neoplasias malignas do ser humano são ainda desconhecidas (WATTENBERG 1997).

Assim, o desenvolvimento de uma segunda linha de prevenção, baseado na quimioprevenção, adquire caráter de excepcional importância (WATTENBERG, 1985; SHARMA *et al.*, 1994; ALBERTS e GARCIA, 1995; ARNOLD *et al.*, 1995; HONG e SPORN, 1997; WATTENBERG, 1997).

Nesse sentido, pode-se conceber, em princípio, dois tipos básicos de quimioprevenção. O primeiro, voltado principalmente para o fornecimento de agentes quimiopreventivos aplicáveis a grandes grupos populacionais, ou seja, podendo culminar, inclusive, com medidas de Saúde Pública em grande escala. As substâncias, nestes casos, deveriam por excelência apresentar toxicidade bastante reduzida, como se observa, por exemplo, com determinados inibidores presentes nos alimentos, tais como os carotenóides e em especial o β -caroteno (PEZZUTO, 1997; GESCHER *et al.*, 1998).

O segundo tipo de estratégia quimiopreventiva estaria direcionado a indivíduos considerados em "alto risco", devido a predisposições genéticas como a polipose adenomatosa

familiar, ou maior exposição a carcinogênicos, como por exemplo, fumantes (KELLOFF *et al.*, 1992; ARNOLD *et al.*, 1995; EL-BAYOUMY *et al.*, 1997; WATTENBERG, 1997). Outras populações alvo incluiriam indivíduos portadores de lesões reconhecidamente pré-cancerosas, como por exemplo displasia cervical, e pacientes previamente tratados por câncer através de quimioterapia e/ou radioterapia (KELLOFF *et al.*, 1992; MORSE e STONER, 1993; HONG e SPORN, 1997).

À medida que o risco de desenvolvimento de câncer aumenta, os compostos mais provavelmente eficazes seriam aqueles que suprimem a evolução do processo neoplásico. Nestes casos poder-se-ia até tolerar, talvez, substâncias que apresentassem maior toxicidade, como é o caso dos retinóides (KELLOFF *et al.*, 1992; MORSE e STONER, 1993).

É grande o número de compostos até agora identificados com eventual atividade quimiopreventiva contra o câncer (WATTENBERG, 1985; BOONE *et al.*, 1990; MORSE e STONER, 1993; SHARMA *et al.*, 1994; ARNOLD *et al.*, 1995; ALBERTS e GARCIA, 1995; PEZZUTO, 1997; STONER *et al.*, 1997). Esta diversidade química pode ser um fator positivo, pois indica que diversas abordagens poderão ser empregadas visando-se a prevenção, além de possibilitar mais opções para a seleção dos agentes mais indicados a cada caso.

Além disso, não se deve esquecer da complexidade da carcinogênese, e de sua evolução prolongada e diversificada. Quanto mais complexo e prolongado o processo patológico, maior o número de possibilidades de se empregar medidas capazes de interromper sua ocorrência final (KELLOFF *et al.*, 1992; ALBERTS e GARCIA, 1995; HONG e SPORN, 1997).

Diversos dos inibidores da carcinogênese até agora identificados são constituintes naturais dos alimentos (DRAGSTED *et al.*, 1993; AMES *et al.*, 1995; EL-BAYOUMY *et al.*, 1997; GESCHER *et al.*, 1998).

Portanto, a investigação dos mecanismos através dos quais a alimentação influencia o câncer, está não só contribuindo para a elucidação de aspectos fundamentais da carcinogênese e do comportamento biológico das neoplasias malignas, como também pode ter ainda um grande impacto em estratégias de prevenção (ROGERS *et al.*, 1993; AMES *et al.*, 1995).

Nesse sentido, a capacidade de substâncias influenciarem as diversas etapas da carcinogênese pode ser usada para se estabelecer uma classificação de *anticarcinogênicos*, e esta ser empregada como fundamento teórico para a seleção de compostos a serem utilizados em seres humanos (DRAGSTED *et al.*, 1993).

Desta forma, baseado em grande parte na ocasião ou período em que agentes quimiopreventivos exibem atividade em modelos de carcinogênese em animais de experimentação, anticarcinogênicos podem ser classificados como *inibidores*, *bloqueadores* ou *supressores*, sendo que os primeiros teriam a capacidade de inibir a formação dos carcinogênicos, os bloqueadores a etapa de iniciação da carcinogênese, enquanto os agentes supressores atuam durante as fases de promoção/progressão (WATTENBERG, 1983; 1985; 1996; MORSE e STONER, 1993; STONER *et al.*, 1997). Durante a investigação de vários anticarcinogênicos tornou-se ainda evidente que alguns compostos atuam em mais do que em uma das etapas da carcinogênese (WATTENBERG, 1985; 1990).

Um exemplo clássico de inibição da carcinogênese através da prevenção da formação de carcinogênicos, é o uso de ácido ascórbico para prevenir a formação de nitrosaminas a partir de aminas secundárias ou amidas e nitritos, no ambiente ácido do estômago (WATTENBERG, 1985; 1990; BERTRAM *et al.*, 1987; MORSE e STONER, 1993; STONER *et al.*, 1997).

Por outro lado, exemplos de anticarcinogênicos bloqueadores seriam compostos organossulfurados do tipo dissulfeto de dialila, presentes no alho, monoterpênicos como o D-limoneno encontrados em frutas cítricas, ou carotenóides como o β -caroteno, presente em frutas e hortaliças (WATTENBERG, 1990; MORSE e STONER, 1993). Estes anti-iniciadores podem atuar através de diversos mecanismos, incluindo a prevenção da formação, captação ou

ativação de carcinogênicos, bem como através da prevenção da alteração genética inicial ou reparação aumentada da lesão do DNA (DRAGSTED *et al.*, 1993; MORSE e STONER, 1993).

Já anticarcinogênicos supressores que apresentam a capacidade de inibir ou retardar a promoção/progressão poderiam inibir a proliferação de células iniciadas ou ativar a diferenciação celular através de vários mecanismos, tais como a antioxição, interação com receptores celulares ou inibição de proteases. Exemplos neste caso seriam o D-limoneno, o β -caroteno e os retinóides (WATTENBERG, 1985; 1990; DRAGSTED *et al.*, 1993; MORSE e STONER, 1993).

2.6 Carotenóides e β -Caroteno

Após o isolamento do primeiro caroteno a partir da cenoura (*Daucus carota*), em 1831, descreve-se, atualmente, a existência na natureza de mais de 600 carotenóides cujas estruturas foram quimicamente caracterizadas, e isto para não mencionar seus respectivos isômeros ópticos e geométricos (BRITTON, 1995; ARMSTRONG e HEARST, 1996).

Este tipo de compostos lipofílicos constitui uma das classes mais abundantes e amplamente distribuídas de pigmentos naturais, sendo sintetizados por microrganismos fotossintéticos e plantas, mas não por animais, que dependem, portanto, inteiramente de fontes da alimentação (ARMSTRONG e HEARST, 1996; FURR e CLARK, 1997). Nesse caso, tais pigmentos presentes, por exemplo, na carne do salmão, carapaça da lagosta e plumagem do flamingo, são originários de fontes vegetais.

Desta forma, descreve-se, nesse sentido, que mais de 50 carotenóides são consumidos em quantidades apreciáveis na alimentação humana, tendo-se já detectado cerca de 34 no plasma e leite humanos, incluindo 13 isômeros geométricos e 8 metabólitos (KHACHIK *et al.*, 1991; 1995; 1997).

Suas fontes vegetais comuns podem ser distribuídas em três grandes grupos (KHACHIK *et al.*, 1991), a saber: no primeiro grupo, que inclui vegetais verdes tais como os brocolis, feijões verdes, espinafre e ervilha, estas apresentam uma ampla variedade de xantofilas e carotenos. Já o segundo, que inclui alimentos do tipo frutas e vegetais de cor amarela/vermelha, tais como o damasco, cenoura, cantalupe e tomates, ricos em carotenos, apresenta uma distribuição mais uniforme de carotenóides em suas fontes de origem vegetal do que o grupo anterior. Finalmente, o terceiro grupo inclui, por exemplo, a abóbora, laranja, ameixa e pêssego, ou seja vegetais também de cor amarela/vermelha, mas cujas fontes contêm xantofilas esterificadas com ácidos graxos, e que necessitam ser digeridas antes da absorção (WINGERATH *et al.*, 1995).

A biossíntese dos carotenóides se dá, inicialmente, a partir da condensação de duas moléculas de acetil-CoA para que estas formem acetoacetil-CoA, que por sua vez se condensa, novamente, com outra molécula de acetil-CoA, o que resulta em β -hidroxi-metil-glutaril-CoA, que através de uma etapa de redução, forma o mevalonato (BAUERNFEIND, 1972). Este, na presença de ATP é inicialmente convertido em fosfomevalonato, com subsequente fosforilação a pirofosfomevalonato, que após etapa de descarboxilação com concomitante hidrólise de ATP, forma a importante unidade biológica isoprênica de 5 carbonos (C_5), o pirofosfato de isopentenila (BAUERNFEIND, 1972; BASU e DICKERSON, 1996a).

Condensações de quatro dessas unidades isoprênicas C_5 dão origem a um intermediário com 20 átomos de carbono (C_{20}), o pirofosfato de geranylgeranila, que ao se condensar cauda-a-cauda com outra de suas moléculas, resulta na formação do primeiro carotenóide acíclico com 40 átomos de carbono, o fitoeno, que, por sua vez, serve de precursor clássico

para outros carotenóides. Uma série de reações de dessaturação e ciclização converte o fitoeno em carotenóides cíclicos, tais como o β -caroteno (BAUERNFEIND, 1972; BRITTON, 1995; ARMSTRONG e HEARST, 1996; BASU e DICKERSON, 1996a; FURR e CLARK, 1997).

Assim, a maioria dos carotenóides contém uma estrutura linear com 40 carbonos (C_{40}) incluindo 3 a 15 duplas ligações conjugadas que determinam, em grande parte, as propriedades espectrais de determinados destes compostos, que tipicamente absorvem luz entre 400 e 500 nm (ARMSTRONG e HEARST, 1996). Este esqueleto pode ser, então, modificado por ciclização em uma ou ambas as extremidades da molécula, por alterações no nível de hidrogenação e por adição de grupamentos funcionais contendo oxigênio.

Carotenóides que apresentam apenas carbono e hidrogênio em suas moléculas são denominados de carotenos, e os que contêm uma ou mais funções de oxigênio são conhecidos como xantofilas. Já aqueles que apresentam estrutura com menos de 40 átomos de carbono, são denominados de apocarotenóides, se estes átomos foram perdidos a partir das extremidades das moléculas ou, então, de norcarotenóides, se perdidos a partir do interior das mesmas (BAUERNFEIND, 1972; BRITTON, 1995).

A característica mais típica e proeminente da estrutura dos carotenóides é o longo sistema alternante de ligações duplas e simples, que forma a parte central da molécula. Isto constitui um sistema conjugado no qual os π -elétrons são deslocados por todo o comprimento da cadeia poliênica. É justamente esta característica que faz com que os carotenóides constituam um grupo distinto de substâncias com diferentes estruturas moleculares, reatividades químicas e propriedades de absorção de luz (KARNAUKHOV, 1990; BRITTON, 1995).

Em princípio, cada dupla ligação da cadeia poliênica de um carotenóide pode existir em duas configurações, *trans* ou *cis*, dependendo da disposição dos grupamentos substituintes. A maioria desses compostos ocorre, entretanto, originalmente na natureza na forma *todo-trans*, termodinamicamente mais estável do que a forma *cis*. Todavia, devido ao elevado número de duplas ligações os carotenóides podem sofrer isomerização de *trans* a *cis*, se expostos à luz em suas respectivas faixas de absorção. Esta interconversão pode ser ainda induzida através de energia térmica ou reações químicas (GERSTER, 1997a).

Além disso, todos os carotenóides com configuração *todo-trans* apresentam um sistema conjugado estendido de duplas ligações, consistindo em moléculas lineares e rígidas. Por outro lado, os isômeros *cis* já não são mais simplesmente lineares e diferem substancialmente dos isômeros *trans* quanto à forma, de modo que suas capacidades de se adaptarem a estruturas subcelulares podem estar bastante alteradas. Assim, estes são mais solúveis e se encontram menos predispostos a sofrerem cristalização, o que possibilita, em princípio, que sejam mais facilmente absorvidos e transportados do que suas contrapartidas *todo-trans* (BRITTON, 1995).

A forma e tamanho dos grupamentos terminais dos carotenóides constituem também importantes fatores. Assim, as moléculas de carotenóides acíclicos como o licopeno são longas e lineares, com grupamentos terminais flexíveis. Já a ciclização encurta o tamanho total da molécula e aumenta o volume efetivo dos grupamentos terminais e o espaço que ocupam (BRITTON, 1995).

Portanto, as características estruturais básicas dos carotenóides determinam as propriedades fisicoquímicas de suas moléculas e, conseqüentemente, respondem, em última instância, por suas funções e ações biológicas, incluindo, por exemplo, a absorção de energia luminosa e fotoproteção, importantes para a fotossíntese, seus papéis como antioxidantes ou pró-oxidantes, bem como suas atividades como pró-vitamina A (BRITTON, 1995; OLSON e KRINSKY, 1995).

Descreve-se que para um carotenóide possuir atividade pró-vitamina A, o composto deve apresentar ao menos um anel β -ionona (trimetil ciclohexano conjugado) não-substituído e

uma cadeia lateral poliênica ligada. A outra extremidade da molécula pode variar quanto à estrutura cíclica ou acíclica e ser alongada, mas não encurtada a um fragmento poliênico contendo menos do que 11-carbonos (BAUERNFEIND, 1972; BASU e DICKERSON, 1996a).

Assim, o carotenóide β -caroteno possui dois anéis β -ionona, um em cada extremidade de uma longa cadeia poliênica com nove duplas ligações, e apresenta, dentre os cerca de 50 carotenóides até o presente descritos como precursores da vitamina A, a maior atividade pró-vitaminica A (BAUERNFEIND, 1972; GOODMAN, 1984; OLSON e KRINSKY, 1995; BASU e DICKERSON, 1996a).

Nesse sentido, a primeira evidência conclusiva de que o β -caroteno atuava como uma pró-vitamina A na nutrição animal foi descrita em 1930 (MOORE, 1930), com a subsequente elucidação, ainda no mesmo ano, da estrutura do β -caroteno e outros carotenóides, bem como constatação da semelhança estrutural entre o β -caroteno e o retinol (vitamina A) ou retinaldeído (KARRER *et al.*, 1930).

Fontes importantes de β -caroteno incluem uma grande variedade de alimentos de origem vegetal, tais como as hortaliças folhudas verde-escuro, a cenoura, batata-doce, tomate, abóbora, manga, melão, e o mamão (PENTEADO *et al.*, 1986; KHACHIK *et al.*, 1991; GODOY e RODRIGUES-AMAYA, 1994; MANGELS *et al.*, 1993; FURR e CLARK, 1997; THANE e REDDY, 1997). Em regiões onde o óleo de dendê é utilizado, sua elevada concentração em β -caroteno representa importante fonte de vitamina A, como por exemplo, no nordeste do Brasil e no oeste do continente africano (TRIGUEIRO e PENTEADO, 1992; BASU e DICKERSON, 1996a).

O isômero 9-*cis* do β -caroteno, bem como outros isômeros *cis* desse carotenóide, são produzidos por certas espécies de algas verdes, e encontrados em alimentos, inclusive após tratamento térmico (CHANDLER e SCHWARTZ, 1987; KHACHIK *et al.*, 1989).

2.6.1 Absorção, Transporte, Metabolismo e Armazenamento do β -Caroteno

A absorção do β -caroteno, bem como dos outros carotenóides, envolve que estes sejam inicialmente liberados da matriz do alimento, onde se encontram associados com proteínas em uma série de estruturas da célula vegetal (ERDMAN *et al.*, 1988; 1993).

Descreve-se que uma alteração física do alimento já antes da ingestão, como por exemplo através da cocção, é capaz de melhorar a liberação de carotenóides a partir da matriz, tais como o licopeno, e o α e β -caroteno (STAHL e SIEHS, 1992; POOR *et al.*, 1993). Além disso, sugeriu-se que efeitos relacionados com a ligação à matriz, seriam responsáveis, provavelmente, pela observação de que não houve melhora do estado nutricional relativo à vitamina A, de mulheres da Indonésia alimentadas com vegetais folhudos de cor verde, em comparação com mulheres que receberam biscoitos manufaturados de modo a conterem quantidade semelhante de β -caroteno em solução oleosa (DE PEE *et al.*, 1995).

Após a ingestão, a hidrólise no estômago dos lípidos e proteínas do alimentos libera os carotenóides da matriz, que se dissolvem, então, na fina emulsão do conteúdo gástrico que passa, a seguir, ao duodeno. Nessa emulsão, a solubilidade e localização dos carotenóides diferem, tendendo os não-polares, ou seja, os carotenos, a permanecerem na região interna, e as xantofilas, carotenóides mais polares, distribuindo-se na superfície (BOREL *et al.*, 1996).

Subsequentemente, ocorre transferência dos mesmos, da emulsão para as micelas, onde os carotenóides também adotam uma solubilização independente em diferentes regiões, de acordo com suas polaridades. Assim, descreve-se que o β -caroteno tende a se solubilizar no

núcleo hidrofóbico da micela, enquanto o retinol, mais polar, é incorporado na superfície da partícula (EL-GORAB e UNDERWOOD, 1973; FURR e CLARK, 1997).

Esta serve como um reservatório de lipídeos e facilita suas travessias pela camada estacionária de água presente na superfície da membrana apical da bordadura em escova do enterócito, que absorve os carotenóides, incluindo o β -caroteno, de forma inalterada e por difusão passiva (HOLLANDER e RUBLE, 1978; MOORE *et al.*, 1996; FURR e CLARK, 1997). É provável que a taxa de difusão seja determinada pelo gradiente de concentração entre a micela e a membrana plasmática do enterócito (PARKER, 1996).

Altas concentrações de β -caroteno presentes no lúmen intestinal tendem a inibir sua própria difusão (PARKER, 1996). Observou-se ainda que a absorção de carotenóides depende de quantidades apropriadas de lipídios, proteínas e fibras presentes na alimentação, bem como de seu próprio conteúdo em carotenóides, que podem competir, inclusive, uns com os outros (ROCK e SWENDSEID, 1992; BOWEN *et al.*, 1993; WHITE *et al.*, 1993).

Assim que no interior do enterócito, o destino de um carotenóide depende de sua estrutura, sendo clivado enzimaticamente em vitamina A, como já foi anteriormente mencionado, se contiver um anel β -ionona não-substituído, associado a uma cadeia lateral poliênica com ao menos 11 átomos de carbono (BAUERNFEIND, 1972; BASU e DICKERSON, 1996a).

Em se tratando do β -caroteno, seu mecanismo de clivagem é controverso, havendo sido sugeridas duas hipóteses, isto é, a da clivagem central ou excêntrica da molécula (OLSON, 1989a; WANG, 1994a; WOLF, 1995).

Nos anos de 1965 e 1983, demonstrou-se que esse carotenóide pode ser convertido em vitamina A através da ação da enzima β -caroteno 15,15'-dioxigenase, presente no citossol dos enterócitos, no fígado e no corpo lúteo (GOODMAN e HUANG, 1965; OLSON e HAYAISHI, 1965; SKLAN, 1983). Nesse caso, oxigênio molecular pode reagir inicialmente com os dois átomos centrais de carbono do β -caroteno, produzindo-se duas moléculas de retinaldeído que são subsequentemente reduzidas a retinol (vitamina A) pela enzima retinaldeído redutase, ou oxidadas à ácido retinóico. Isto foi confirmado em 1989, quando se observou a formação de retinol a partir do β -caroteno, em ensaio *in vitro* utilizando mucosa intestinal de coelhos ou ratos (LAKSHMAN *et al.*, 1989).

A enzima β -caroteno 15,15'-dioxigenase tem a capacidade de clivar não apenas o β -caroteno todo-*trans*, mas também outros isômeros desse carotenóide. Relata-se que o isômero 9-*cis* do β -caroteno é também convertido em retinal, embora menos eficientemente do que a forma todo-*trans* (NAGAO e OLSON, 1994). Acredita-se ainda que outros carotenóides com atividade pró-vitamina A sejam também convertidos pela enzima, apesar de sua especificidade não estar ainda bem estabelecida (VAN VLIET, 1996).

Já a ocorrência da clivagem excêntrica do β -caroteno foi detectada pela primeira vez em plantas e microrganismos (GLOVER, 1960) e, a seguir, no intestino de ratos, galináceos, "ferrets" (*Mustela putorius furo*), macacos e seres humanos (SHARMA *et al.*, 1977; GANGULY e SASTRY, 1985; TANG *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 1991). A reação dá origem a diferentes cadeias de 12'-, 10'- e 8'- β -apo-carotenais, que podem ser, então, convertidos em retinaldeído ou oxidados em ácidos β -apo-carotenóicos. Estes últimos são também possíveis precursores do ácido retinóico (NAPOLI e RACE, 1988). Além disso, alguns dos apocarotenais são relativamente polares, podendo ser transportados do intestino ao fígado através do sistema porta (FURR e CLARK, 1997).

Não existe até o momento, entretanto, consenso na literatura quanto à importância relativa da clivagem central ou excêntrica do β -caroteno para a formação de retinóides, apesar de se ter conhecimento da ocorrência de ambas (HANSEN e MARET, 1988; WANG, 1994).

Todavia, descreve-se que a produção de ácido retinóico a partir do β -caroteno pode ocorrer preferencialmente através da clivagem excêntrica da molécula do carotenóide, pois esta via resulta em β -apo-carotenais que podem dar origem diretamente ao ácido retinóico, ao invés de retinaldeído (WANG, 1994).

Assim, a produção de ácido retinóico a partir de β -caroteno pode ocorrer no "ferret", rato, Macaco e ser humano, tanto no intestino delgado como em tecidos periféricos, tais como o pulmão, rim, fígado e tecido adiposo (NAPOLI e RACE, 1988; WANG *et al.*, 1991). Sugere-se que este ácido retinóico produzido a partir do metabolismo do β -caroteno, teria um efeito regulatório no metabolismo da vitamina A, via retroalimentação inibitória da oxidação do retinol e estimulação de sua esterificação (WANG *et al.*, 1993; WANG, 1994).

A razão de conversão do β -caroteno em vitamina A no organismo, que usualmente é de 6:1 em seres humanos (BAUERNFEIND, 1972; BRUBACHER e WEISER, 1985), depende de fatores como por exemplo da atividade tireoidiana, da presença ou ausência de estresse, presença de interferentes nos alimentos, tais como concentrações elevadas ou reduzidas de nitratos, proteínas ou lipídeos, e, principalmente, das próprias concentrações do carotenóide nos alimentos (SOLOMONS e BULUX, 1993).

Doses elevadas de β -caroteno resultam em importante redução na eficiência de conversão (BAUERNFEIND, 1972; BRUBACHER e WEISER, 1985). relata-se ainda que a absorção e a extensão da clivagem intestinal do β -caroteno em vitamina A dependem, ao menos no rato, da concentração da vitamina A na ração (VAN VLIET *et al.*, 1996).

Portanto, o grau de conversão de β -caroteno em vitamina A é regulado por mecanismos homeostáticos, dependendo, por exemplo, da quantidade de vitamina A pré-formada na alimentação e da saturação dos depósitos de vitamina A do organismo (GERSTER, 1991). Estes mecanismos limitariam a conversão do carotenóide, no sentido de uma proteção contra eventual toxicidade pela vitamina A.

Descreve-se, ainda, que a razão de conversão de outros carotenóides com atividade pró-vitáminica A em retinol é de aproximadamente a metade daquela do β -caroteno (KRINSKY, 1989b). Além disso, estudos conduzidos entre 1944 e 1952 demonstraram que estereoisômeros *cis-trans* do β -caroteno também apresentam menor taxa de conversão em vitamina A do que o isômero todo-*trans* (DEUEL *et al.*, 1944; ZECHMEISTER *et al.*, 1952).

Na espécie humana, a maior parte do β -caroteno absorvido é convertida nos enterócitos em retinol e, a seguir, em ésteres de retinila (VAN VLIET, 1996). Entretanto, descreve-se que aproximadamente 15% desse carotenóide na sua forma intacta, podem ser encontrados no sistema linfático (GOODMAN *et al.*, 1966).

Observou-se ainda que 20-40% do β -caroteno presente em tecidos humanos se encontram na forma de isômeros *cis*, ao mesmo tempo em que não se conseguiu demonstrar suas presenças no plasma (STAHL *et al.*, 1992), nem mesmo após suplementação com uma preparação de β -caroteno contendo 60% na forma de isômero *cis* (JENSEN *et al.*, 1987). Isto poderia indicar, portanto, que os isômeros *cis* do β -caroteno são depurados preferencialmente do plasma (VAN VLIET, 1996).

Desta forma, os seres humanos podem acumular a molécula íntegra do β -caroteno no sangue e tecidos, o mesmo se observando em outros mamíferos tais como o cavalo e o "ferret" (BONDI e SKLAN, 1984).

Em outros animais, como o rato, coelho, porco e galináceos, descreve-se, entretanto, que grandes quantidades do carotenóide presente na alimentação são convertidas em vitamina A (HUANG e GOODMAN, 1965; WANG, 1994; PARKER, 1996), não estando, portanto, o rato

indicado como modelo *in vivo* para o estudo do metabolismo do β -caroteno (BENDICH e OLSON, 1989; RIBAYA-MERCADO *et al.*, 1989; WANG, 1994).

Todavia, vários estudos têm demonstrado, inclusive mais recentemente, que essa espécie pode acumular grandes quantidades do carotenóide intacto, especialmente no fígado, quando este é adicionado à ração ou administrado por sonda gástrica (MATHEWS-ROTH, 1977; SHAPIRO *et al.*, 1984; KRINSKY *et al.*, 1990; MORENO *et al.*, 1991; OKOH *et al.*, 1993; BIANCHI-SANTAMARIA *et al.*, 1994; SARKAR *et al.*, 1994; MORENO *et al.*, 1995a; TEE *et al.*, 1996; RIZZI *et al.*, 1997).

Em contraste com o retinol, não se relatou a existência no enterócito de proteína intracelular capaz de se ligar a carotenóides, talvez devido à presença de grande número desses compostos na alimentação (PARKER, 1996). Entretanto, demonstrou-se a existência de um complexo proteína-carotenóide no fígado de ratos alimentados com rações contendo β -caroteno, possivelmente envolvido com o armazenamento e transporte da molécula intacta desse carotenóide (OKOH *et al.*, 1993).

Recentemente descreveu-se também a purificação e caracterização parcial de uma proteína celular ligadora de β -caroteno com 67 kDa no fígado de "ferrets", capaz ainda de se ligar ao α -caroteno e à criptoxantina, mas não a outros carotenóides testados, o que sugere um elevado grau de especificidade de ligação apenas a carotenóides com ao menos um anel β -ionona não-substituído (RAO *et al.*, 1997). Esta proteína poderia desempenhar um papel importante no armazenamento, transporte, direcionamento e proteção do β -caroteno contra a degradação.

Os carotenóides que não sofreram clivagem no enterócito são, então, incorporados em quilomícrons e transferidos por exocitose ao sistema linfático e, a seguir, para a circulação sistêmica. Em células periféricas essas lipoproteínas resultam na formação, após hidrólise de parte de seus triacilgliceróis pela lipase de lipoproteína, dos assim chamados remanescentes de quilomícrons, que são, subsequentemente, captados por hepatócitos que apresentam receptores B/E em suas superfícies (MAHLEY e HUSSAIN, 1991).

No fígado, os carotenóides ainda presentes nesses remanescentes de quilomícrons podem ser convertidos em retinóides ou incorporados em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), sendo a seguir, novamente transportados às células periféricas e transferidos para as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (BLOMHOFF, 1994; VAN VLIET, 1996). Assim, descreve-se que principalmente a LDL (CLEVIDENCE e BIERI, 1993; TRABER *et al.*, 1994), mas também a lipoproteína de alta densidade (HDL) (PARKER, 1996), representam, na verdade, os principais meios de transporte de β -caroteno no plasma.

Relata-se, ainda, que o fígado é o principal sítio de acúmulo de β -caroteno no organismo, quando rações suplementadas com esse carotenóide foram administradas a espécies tais como ratos e galináceos (LEVIN *et al.*, 1994), ou quando o β -caroteno foi adicionado à água fornecida a camundongos (YAMA *et al.*, 1996). Nesse sentido, quanto à localização subcelular, demonstrou-se que esse carotenóide está principalmente presente na fração mitocondrial e, a seguir, nos lisossomos de fígado de animais dessas espécies (MAYNE e PARKER, 1986; OKOH *et al.*, 1993).

Já em seres humanos, o β -caroteno foi detectado nas adrenais, fígado, testículos, tecido adiposo, pele, rins e pulmões (RAICA *et al.*, 1972; MATHEWS-ROTH, 1991; SCHMITZ *et al.*, 1991; FURR e CLARK, 1997).

De uma forma geral, a dinâmica da absorção, transporte no plasma, depuração e metabolismo é altamente dependente da natureza química do carotenóide (ZENG *et al.*, 1992). Assim, relata-se a existência de capacidade de discriminação em relação à absorção, ou até

mesmo em relação ao transporte, dos isômeros *todo-trans* e *9-cis* do β -caroteno, em favor do primeiro (GAZIANO *et al.*, 1995; STAHL *et al.*, 1995).

Descreve-se também que os isômeros *todo-trans* e *9-cis* desse carotenóide, que podem ainda sofrer interconversão, são rapidamente metabolizados mas que o primeiro resulta apenas em produtos *todo-trans*, enquanto o β -caroteno *9-cis* dá origem a uma mistura de produtos *todo-trans* e *9-cis* (NAGAO e OLSON, 1994; WANG *et al.*, 1994).

Observa-se, ainda, em seres humanos, a ocorrência, durante ou após a absorção, de isomerização para a forma *9-cis* após ingestão de β -caroteno *todo-trans* (TAMAI *et al.*, 1995), bem como de isomerização *cis-trans* do β -caroteno *9-cis*, durante sua absorção e antes da secreção para a corrente sanguínea (YOU *et al.*, 1996). Neste último caso, sugere-se que isto limitaria o fornecimento de retinóides *9-cis* aos tecidos, aumentando ainda o valor em vitamina A do carotenóide.

Assim, estudos *in vitro* utilizando homogenatos de intestino ou fígado demonstram a ocorrência de síntese de retinaldeído *9-cis* e ácido retinóico *9-cis*, após incubação com β -caroteno *9-cis* (NAGAO e OLSON, 1994; WANG *et al.*, 1994). Além disso, relatou-se em "ferrets", a ocorrência de síntese *in vivo* de ácido retinóico *9-cis* a partir do isômero *9-cis* do β -caroteno (HEBUTERNE *et al.*, 1995).

A presença de precursores e a biossíntese de ácido retinóico *9-cis* têm grande importância biológica, devido ao fato de que este pode agir como ligante para receptores nucleares capazes de modular a expressão gênica (MANGELSDORF, 1994; NAGAO e OLSON, 1994; PARKER, 1996).

2.6.2 Propriedades Biológicas do β -Caroteno

Devido ao grande número de propriedades já atribuídas aos carotenóides, sugeriu-se que estas poderiam ser distribuídas em três categorias, ou seja, *funções*, *ações* ou *associações*, úteis para se classificar as várias relações entre carotenóides e processos fisiológicos ou biológicos (BENDICH e OLSON, 1989; OLSON, 1989b; KRINSKY, 1994).

Funções podem ser definidas como os papéis essenciais que estes desempenham, ao menos sob certas condições determinadas. Portanto, a ausência do carotenóide resulta, neste caso, em incapacidade fisiológica e, eventualmente, até em morte. Já *ações* podem ser consideradas respostas fisiológicas ou farmacológicas à administração de carotenóides. Entretanto, a resposta, que pode ser benéfica ou deletéria, não é essencial ao bem estar fisiológico. Finalmente, as *associações* definem correlações entre carotenóides e algum evento fisiológico ou biológico que possa, ou não, apresentar efetivamente uma relação causal (BENDICH e OLSON, 1989).

Em algumas instâncias, entretanto, as diferenças estabelecidas entre *ações* e *associações* não são claras, podendo-se combiná-las em um único grupo (KRINSKY, 1994).

Em se tratando do β -caroteno, sua *função* de conversão em vitamina A é bastante conhecida, bem como sua capacidade de fotoproteção, inclusive na protoporfiria eritropoiética e outras doenças fotossensíveis. Por outro lado, descreve-se que suas *ações* e *associações* mais importantes consistiriam, basicamente, em efeitos nas atividades de diversas enzimas, atividade antioxidante/pró-oxidante, capacidade de modular a expressão gênica e a resposta imune, e de, eventualmente, ter influência na reprodução e fertilidade, bem como em diversas doenças degenerativas tais como a catarata, degeneração Macular relacionada com a idade, aterosclerose e o câncer (BENDICH e OLSON, 1989; ROSS e TERNUS, 1993; KRINSKY, 1994;

MEYDANI *et al.*, 1995; OLSON e KRINSKY, 1995; OLSON, 1996; BURRI, 1997; SILVEIRA e MORENO, 1998).

2.6.3 β -Caroteno e Câncer

2.6.3.1 Estudos em Humanos

Desde a publicação da extensa revisão de PETO *et al.* (1981), que incluiu oito estudos retrospectivos de diversos países e uma região em que as concentrações séricas de retinol de pacientes portadores de câncer recém diagnosticado eram significativamente menores do que as do grupo controle, e da consequente hipótese de que o β -caroteno poderia reduzir a incidência de câncer, têm se acumulado evidências obtidas a partir de inúmeros estudos epidemiológicos, retrospectivos e prospectivos, de que indivíduos que ingerem maiores quantidades de frutas e hortaliças ricas em carotenóides, ou com concentrações sanguíneas mais elevadas de β -caroteno, apresentam menor risco de desenvolvimento de cânceres em diversos órgãos, especialmente no pulmão e estômago (ZIEGLER, 1991; BLOCK *et al.*, 1992; VAN POPPEL e GOLDBOHN, 1995; MAYNE, 1996; ZIEGLER *et al.*, 1996a; NAVES e MORENO, 1998).

Entretanto, nesse interim, não se conseguiu estabelecer de forma conclusiva relação exclusiva entre a ingestão de β -caroteno e o câncer através dos dados epidemiológicos observacionais disponíveis, pois a maioria das investigações não analisou especificamente o consumo do carotenóide e nem explorou, adequadamente, a influência relativa de fatores interferentes presentes na alimentação, como por exemplo, a presença concomitante de outros carotenóides ou componentes tais como minerais, fibras e outros fitoquímicos, bem como do colesterol, carne ou bebidas alcoólicas (MAYNE, 1996; NAVES e MORENO, 1998).

Além disso, descreve-se que a concentração de β -caroteno no sangue poderia também apenas refletir o consumo de frutas e hortaliças, e ser afetada por variáveis não adequadamente controladas na maioria dos estudos, como por exemplo, o tabagismo (ZIEGLER *et al.*, 1992; KOO, 1997).

Todavia, este tipo de investigação possibilitou que se concluísse que o β -caroteno, se protetor, seria mais efetivo quando ingerido em quantidades fisiológicas normalmente encontradas em uma alimentação rica em frutas e hortaliças, ou seja, cerca de 4 a 6 mg/dia (SHEKELLE *et al.*, 1981; ZIEGLER *et al.*, 1992, 1996b), e que teria principalmente ação nas etapas iniciais da carcinogênese (STÄHELIN *et al.*, 1991; VAN POPPEL e GOLDBOHN, 1995).

Assim, a consistência dos resultados dos estudos epidemiológicos observacionais em relação aos carotenóides e a prevenção do câncer de pulmão, bem como os dados então disponíveis relativos à ausência de toxicidade do β -caroteno (BENDICH, 1988) e sua eficácia na quimioprevenção em modelos de carcinogênese experimental (MATHEWS-ROTH, 1985), serviu de estímulo ao desenvolvimento de estudos em grande escala em seres humanos, com suplementação farmacológica crônica do carotenóide, isoladamente ou em combinação com outros nutrientes.

Desta forma, no Tyler Chemoprevention Trial administrou-se β -caroteno (50 mg/dia) e retinol (25.000 UI em dias alternados) a indivíduos expostos ao asbesto por motivos profissionais, na tentativa de se avaliar se esta combinação poderia reduzir a prevalência de células atípicas no escarro (MCLARTY *et al.*, 1995). Ao contrário do que se esperava, após um

período de intervenção de 58 meses observou-se nos indivíduos que receberam os suplementos, aumento não-significante de atúpia no escarro.

Já se havia descrito, por outro lado, em um estudo aleatório de intervenção conduzido anteriormente por 14 semanas, que a suplementação com β -caroteno (20 mg/dia) reduziu significativamente a contagem de micronúcleos no catarro de fumantes inveterados (VAN POPPEL *et al.*, 1992).

Três investigações publicadas mais recentemente não detectaram, entretanto, qualquer efeito protetor na incidência de diversos cânceres, quando o β -caroteno foi administrado isoladamente ou em combinação com a vitamina A, a milhares de indivíduos (THE ALPHA TOCOPHEROL, BETA-CAROTENE CANCER PREVENTION STUDY GROUP, 1994; HENNEKENS *et al.*, 1996; OMENN *et al.*, 1996).

Duas destas chegaram a demonstrar, inclusive, que o carotenóide poderia ter um efeito deletério, aumentando a incidência de câncer pulmonar (THE ALPHA TOCOPHEROL, BETA-CAROTENE CANCER PREVENTION STUDY GROUP, 1994; OMENN *et al.*, 1996).

Como estas investigações foram conduzidas em populações consideradas "de alto risco" para o desenvolvimento de câncer de pulmão (fumantes inveterados, ex-fumantes ou indivíduos expostos ao asbesto), e como os suplementos em doses farmacológicas crônicas foram administrados em uma fase em que já era possível que a carcinogênese pulmonar se encontrasse em suas etapas mais tardias, sugeriu-se que seus resultados negativos não deveriam ser generalizados para toda a população. Não se deveria descartar ainda definitivamente um possível papel do β -caroteno na prevenção do câncer, especialmente se este fosse administrado nas fases iniciais da carcinogênese e em quantidades mais fisiológicas, associado a substâncias antioxidantes, como as naturalmente encontradas em uma alimentação rica em frutas e hortaliças (GRADELET *et al.*, 1998; NAVES e MORENO, 1998).

Assim, descreveu-se que o β -caroteno demonstrou efeitos quimioprotetores contra os cânceres de esôfago e cárdia, quando administrado em concentrações menores do que as utilizadas na maioria dos outros estudos e concomitantemente à vitamina E e selênio, a milhares de indivíduos de populações de Linxian, na China, e que apresentavam consumo reduzido de nutrientes e concentrações plasmáticas reduzidas do carotenóide (BLOT *et al.*, 1993).

Relatou-se, ainda, que em seres humanos a suplementação com β -caroteno se mostrou eficaz na reversão da leucoplaquia, considerada uma lesão pré-neoplásica do câncer da cavidade oral. Este efeito protetor foi inicialmente constatado em investigação realizada na Índia em mascaradores de fumo ou de noz de areca (STICH *et al.*, 1988a).

A seguir, diversos estudos demonstraram reversão ou supressão de 50 a 60% dos casos de leucoplaquia, em indivíduos tratados com cerca de 30 a 60 mg/dia de β -caroteno, por aproximadamente seis meses (GAREWAL, 1995). Mais recentemente, descreveu-se ainda redução significativa no número e grau de displasia da mucosa oral, em 97,5% dos casos tratados com o carotenóide associado às vitaminas E e C, por período de 12 semanas consecutivas (BARTH *et al.*, 1997).

Resultados promissores foram também relatados em mulheres portadoras de displasias de colo uterino, que receberam suplementos de β -caroteno (30 mg/dia) por via oral durante 6 meses consecutivos (MEYSKENS JR. e MANETTA, 1995).

2.6.3.2 Estudos *in vitro* e em Animais de Experimentação

Em 1973, DOROGOKUPLA e colaboradores, *apud* MATHEWS-ROTH (1989), induziram cânceres subcutâneos e de pele em camundongos e ratos, através da administração de 9,10-dimetil-1,2-benz(a)antraceno (DMBA), observando que aqueles animais tratados com uma ração suplementada com "quantidades ilimitadas de cenoura" desenvolviam neoplasias mais lentamente do que aqueles alimentados com rações não-suplementadas, e propondo que o efeito do β -caroteno poderia ser devido, neste caso, à sua transformação em vitamina A.

Nesse mesmo ano EPSTEIN (1973) descreveu que camundongos "hairless" expostos à radiação ultravioleta do tipo B (UV-B), e que recebiam injeções de β -caroteno, desenvolviam cânceres de pele a uma menor velocidade do que camundongos que apenas recebiam injeções de placebo.

A seguir, SEIFTER e colaboradores (1981; 1982; RETTURA *et al.*, 1982), em uma série de experimentos conduzidos em camundongos, relataram que a vitamina A e o β -caroteno eram capazes de inibir o desenvolvimento e reduzir as dimensões de neoplasias malignas transplantadas ou induzidas por vírus.

Posteriormente, MATHEWS-ROTH (1982; 1983) observou que as administrações de cantaxantina e fitoeno, um carotenóide sem atividade pró-vitáminica A e um derivado isoprênico, respectivamente, bem como de β -caroteno, protegiam camundongos "hairless" contra cânceres cutâneos induzidos por radiação UV-B ou aplicação de DMBA como agentes iniciantes, seguida da aplicação de óleo de cróton como agente promotor, retardando seus aparecimentos e reduzindo seus números por animal.

Outras investigações utilizando modelos experimentais semelhantes tiveram oportunidade de confirmar os resultados desses experimentos, em que os carotenóides foram administrados por via oral, antes ou durante a formação das neoplasias, ou seja, nas fases de iniciação ou promoção da carcinogênese (SANTAMARIA *et al.*, 1983; SEIFTER *et al.*, 1984; MATHEWS-ROTH e KRINSKY, 1985).

Nesse sentido, demonstrou-se ainda, posteriormente, que o β -caroteno era também capaz de inibir a carcinogênese de pele UV-induzida em camundongos, quando o tratamento com o carotenóide foi iniciado após término da aplicação da irradiação UV-B, ou seja, durante a fase de progressão da carcinogênese (MATHEWS-ROTH e KRINSKY, 1987).

Anteriormente, entretanto, SHAMBERGER (1971) já havia descrito que a aplicação tópica de β -caroteno era capaz de aumentar a formação de neoplasias cutâneas, em camundongos submetidos a modelo experimental de carcinogênese induzida pelo DMBA e óleo de cróton.

Em contraste, em uma observação já mais recente, relatou-se que o β -caroteno apresentou um efeito protetor quando administrado topicamente tanto durante a fase de iniciação como de promoção de modelo de carcinogênese oral em "hamsters", induzida pela aplicação tópica de DMBA como agente iniciante e de peróxido de benzoila como agente promotor (SUDA *et al.*, 1986). Atribuiu-se, nesse caso, a ação protetora do carotenóide a uma indução de um fator de necrose tumoral em macrófagos (SCHWARTZ *et al.*, 1986).

Descreveu-se ainda posteriormente nesse modelo de carcinogênese oral em "hamsters", uma redução significativa no número de neoplasias por animal, quando o β -caroteno foi administrado por via oral (ALAM e ALAM, 1987; SCHWARTZ *et al.*, 1988).

Analisando parte dessas observações, MATHEWS-ROTH (1989) concluiu que as mesmas sugeriam, de uma forma geral, que a atividade protetora do β -caroteno poderia ser

diretamente atribuída à própria molécula do carotenóide, através de sua capacidade de sequestrar radicais livres, ou seja, sua ação antioxidante, e não à sua função de atuar indiretamente no organismo como pró-vitamina A.

Nesse sentido, SOM e colaboradores (1984), procurando ainda avaliar de forma mais específica a ação quimiopreventiva do β -caroteno na carcinogênese, observaram que este carotenóide era capaz de inibir a transformação *in vitro* de glândulas mamárias induzida pelo DMBA, concluindo que este efeito ocorria tanto na fase de iniciação como de promoção, pois podia ser observado quando o β -caroteno era adicionado à cultura concomitantemente ao DMBA ou 4-10 dias após. Sugeriu-se também neste caso que este efeito inibitório poderia ser atribuído, provavelmente, a uma ação direta do β -caroteno, talvez relacionada à capacidade do carotenóide de reduzir a troca de cromátides irmãs, pois não havia acúmulo detectável de retinól nas glândulas durante 10 dias de cultura de tecido.

Por outro lado, experimentos realizados com células C3H 10T1/2 em que se adicionava β -caroteno ou cantaxantina à cultura, demonstraram que estes compostos reduziram a extensão da transformação maligna induzida por metilcolantreno ou raios X, quando administrados 1 semana após o tratamento, ou seja, na fase de promoção (PUNG *et al.*, 1988). Como não se detectava conversão do ^{14}C - β -caroteno em ^{14}C -retinóides, sugeriu-se que o carotenóide deveria estar atuando de forma intrínseca nessas condições experimentais, e não como pró-vitamina A (RUNDHAUG *et al.*, 1988).

A atividade protetora *in vivo* do β -caroteno, que parece ocorrer especialmente em casos de neoplasias de origem epitelial (GERSTER, 1993), foi também observada em diversos outros modelos experimentais de carcinogênese.

Assim, relatou-se ainda uma redução na incidência de câncer de cólon em camundongos alimentados com rações suplementadas com o carotenóide e submetidos à administração de dimetilhidrazina (DMH) (TEMPLE e BASU, 1987).

Além disso, descreveu-se que a administração de rações suplementadas com β -caroteno a camundongos Skh tratados com DMBA como agente iniciante da carcinogênese e um éster de forbol como promotor, teve um efeito protetor ao reduzir em 32% o aparecimento de neoplasias de pele (LAMBERT *et al.*, 1994).

Da mesma forma, camundongos CD-1 submetidos à aplicação tópica de DMBA por 60 dias e subsequentemente tratados durante 14 dias consecutivos com β -caroteno dissolvido em óleo de amendoim e por intubação gástrica, apresentaram redução significativa no tamanho de papilomas cutâneos, quando comparados a animais do grupo controle (KATSUMURA *et al.*, 1996). Sugeriu-se, neste último caso, que a ação anticarcinogênica *in vivo* do carotenóide poderia ser atribuída a uma atividade intrínseca da molécula do β -caroteno, e não à sua função como pró-vitamina A.

Os resultados destes estudos estavam de acordo com experimento realizado anteriormente em camundongos SENCAR submetidos a modelo semelhante de carcinogênese de pele induzida pelo DMBA, em que se observou que o carotenóide suplementado na ração foi capaz de inibir a conversão de papilomas a carcinomas cutâneos (CHEN *et al.*, 1993).

Demonstrou-se, ainda, que a administração de β -caroteno na ração durante as fases de iniciação e pós-iniciação da carcinogênese oral induzida pelo agente iniciador 1-óxido de 4-nitroquinolina, resultou em significativa redução na frequência de aparecimento de carcinomas de língua em ratos F-344 (TANAKA *et al.*, 1994) e que o carotenóide, quando administrado simultaneamente a rações contendo elevados teores de gordura durante a fase de promoção de modelo de carcinogênese pancreática, foi também capaz de inibir em ratos a formação de focos basofílicos no pâncreas desencadeada pela aplicação de azasserina, enquanto

em "hamsters" resultou em reduções significantes no aparecimento de complexos ductais iniciais e no número de carcinomas, após administração de *N*-nitrosobis(2-oxopropil)amina (WOUTERSEN e VAN GARDEREN-HOETMER, 1988).

Estas observações foram confirmadas mais recentemente. Assim, demonstrou-se também uma ação inibitória do β -caroteno quando adicionado à ração em uma suspensão de óleo de milho a 30%, em ratos tratados com azasserina como indutor da carcinogênese pancreática, constatando-se que esse efeito protetor foi mais pronunciado quando o carotenóide foi administrado durante a fase de promoção tardia do processo carcinogênico (APPEL e WOUTERSEN, 1996). Além disso, descreveu-se que o β -caroteno suplementado nas rações também apresentou efeitos inibitórios reduzindo o número de lesões pré-neoplásicas ductais, bem como o de carcinomas *in situ* e invasivos, na carcinogênese pancreática iniciada em "hamsters" pelo carcinogênico *N*-nitrosobis(2-oxopropil)amina (MAJIMA *et al.*, 1998).

O potencial quimiopreventivo do carotenóide quando suplementado nas rações ou administrado por via subcutânea, foi ainda recentemente avaliado em modelo de carcinogênese pulmonar induzida em camundongos pelo carcinógeno tabaco-específico, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, observando-se que não houve inibição na formação do número total de neoplasias, que incluíam adenomas e adenocarcinomas, embora o β -caroteno reduzisse significativamente a incidência de adenocarcinomas, ou seja, retardasse a progressão maligna (CONAWAY *et al.*, 1998).

Entretanto, nem todos os estudos com o β -caroteno foram capazes de demonstrar, *in vivo*, uma ação protetora na carcinogênese experimental. Assim, não se constatou em "hamsters" alimentados com rações contendo o carotenóide e submetidos à instilação intratraqueal de benzo(α)pireno ligado a óxido férrico, efeito protetor significativo quando se levou em conta o número ou tipo de neoplasias do trato respiratório (BEEMS, 1987). Todavia, sugeriu-se que esta observação específica é questionável, pois o tratamento com β -caroteno não resultou, nessas condições experimentais, e como era de se esperar, em alterações significantes nos níveis séricos de retinol (KRINSKY, 1991).

Não se constataram efeitos significantes na prevenção de cânceres colorretais, em ratos administrados com DMH e alimentados com rações suplementadas com o carotenóide na forma de grânulos ("beadlets") (COLACCHIO e MEMOLI, 1986). Quando adicionada à ração, esta apresentação granular do β -caroteno também não resultou em atividade protetora digna de nota em modelos de carcinogênese de estômago e intestino delgado, bem como colorretal, em ratos tratados com *N'*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG) adicionada à água dos bebedouros por 52 semanas consecutivas, ou por instilação intrarretal, apesar de se ter observado nesse estudo, leve redução na incidência de adenocarcinomas gástricos (JONES *et al.*, 1989).

Todavia, descreveu-se em um experimento mais prolongado que este último, e conduzido durante 550 dias, que o carotenóide foi capaz de prevenir o câncer gástrico induzido em ratos pela administração oral de MNNG (SANTAMARIA *et al.*, 1987).

2.6.3.2.1 β -Caroteno e Hepatocarcinogênese Experimental

A ação quimiopreventiva do β -caroteno foi também avaliada em modelos de hepatocarcinogênese. Assim, RIEDER e colaboradores (1983), *apud* ASTORG *et al.* (1996), observaram, pela primeira vez, que rações suplementadas com cenouras eram capazes de

retardar em ratos o aparecimento de hepatomas induzidos pela aplicação de DEN, embora não houvessem evidências de que este efeito pudesse ser atribuído diretamente ao β -caroteno.

Mais recentemente constatou-se, entretanto, e de uma forma mais controlada, ação inibitória do carotenóide no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (focos e nódulos de hepatócitos) de ratos Wistar submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH), quando este foi administrado por intubação gástrica dissolvido em óleo de milho, principalmente durante período que abrangia as fases de iniciação e seleção/promoção concomitantemente ou apenas a etapa da iniciação, mas também quando aplicado tão somente durante a fase de promoção precoce da hepatocarcinogênese (MORENO *et al.*, 1991; 1995a; RIZZI *et al.*, 1997; DAGLI *et al.*, 1998; OLIVEIRA, 1998; FIORIO, 1998).

Demonstrou-se, ainda, nessas condições experimentais, que a administração de β -caroteno resultou em aumento das concentrações hepáticas do carotenóide, bem como da vitamina A total (MORENO *et al.*, 1991; 1995a; RIZZI *et al.*, 1997; OLIVEIRA, 1998). Por outro lado, ratos tratados com vitamina A e submetidos ao modelo do hepatócito resistente, além de não apresentarem efeitos inibitórios dignos de nota durante as fases iniciais da hepatocarcinogênese, também não demonstraram, como era de se esperar, aumento das concentrações hepáticas de β -caroteno, embora apresentassem concomitantemente aumento acentuado das concentrações hepáticas de vitamina A total.

Estas evidências possibilitaram, portanto, que se chegasse à conclusão de que o efeito quimiopreventivo do carotenóide poderia ser atribuído, nesses casos, a uma ação intrínseca do β -caroteno inerente à sua própria molécula e não à sua função como pró-vitamina A (MORENO *et al.*, 1995a; RIZZI *et al.*, 1997).

O efeito inibitório do β -caroteno na hepatocarcinogênese foi também posteriormente observado em outros estudos, empregando, inclusive, diferentes modelos experimentais e outras linhagens de ratos, bem como outros animais.

Assim, confirmando os resultados dos experimentos descritos anteriormente, descreveu-se que a administração de rações suplementadas com o carotenóide a ratos da linhagem Sprague-Dawley era capaz de inibir a hepatocarcinogênese induzida pelos carcinógenos 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) (SARKAR *et al.*, 1994), DEN (SARKAR *et al.*, 1995a) ou 3'-metil-4-dimetilaminoazobenzeno (3'-MDAB) (SARKAR *et al.*, 1995b), quando ocorria também principalmente durante período que abrangia as etapas de iniciação e seleção/promoção concomitantemente, ou apenas a etapa de iniciação.

Relatou-se ainda que o β -caroteno suplementado nas rações foi capaz de exercer efeitos inibitórios em lesões pré-neoplásicas (focos de hepatócitos) presentes durante a etapa de iniciação da hepatocarcinogênese, induzida em ratos por modelo experimental que empregava como processo de iniciação, dose única intragástrica do carcinogênico de alimentos 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina (IQ) aplicada 12 horas após realização de hepatectomia parcial a dois terços, seguidas por administração de fenobarbital e dose única de D-galactosamina como regime promotor (TSUDA *et al.*, 1994).

Da mesma forma, observou-se que a administração a ratos Fischer 344, por intubação gástrica, de extratos de alimentos ricos em carotenóides como o β -caroteno (cenouras), inibiu o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (focos de hepatócitos) presentes nas fases iniciais da hepatocarcinogênese induzida pela aplicação de aflatoxina B1 (HE *et al.*, 1997).

Além disso, em modelo de hepatocarcinogênese experimental induzida pela injeção de DMBA durante 12 semanas consecutivas (1 mg/2 vezes/semana) no sapo (*Bufo viridis*), descreveu-se que a aplicação de β -caroteno (0,05 mg) três horas antes da administração do

carcinogênico, ou seja antes da iniciação, mas não a aplicação três horas após, foi capaz de bloquear completamente o desenvolvimento de carcinomas hepatocelulares (SADEK e HAYAT, 1996).

No entanto, ASTORG e colaboradores (1996) não observaram efeito inibitório do β -caroteno hidrossolúvel a 10% suplementado a rações purificadas semilíquidas, ou administrado por via intraperitoneal em uma emulsão hidrossolúvel a 5%, em lesões pré-neoplásicas induzidas em ratos Wistar por um protocolo sequencial de hepatocarcinogênese bastante semelhante ao do hepatócito resistente, e que também empregava DEN como agente iniciante, embora utilizasse posteriormente fenobarbital como agente promotor (ASTORG *et al.*, 1996).

Todavia, este mesmo grupo de investigadores em publicações nos anos de 1997 e 1998, descreveu, a seguir, que o β -caroteno hidrossolúvel a 10% adicionado a dietas purificadas semilíquidas, foi muito eficiente durante a fase de iniciação em reduzir o número e tamanho de focos pré-neoplásicos de hepatócitos induzidos por protocolo de hepatocarcinogênese também semelhante ao modelo do hepatócito resistente, que empregava, entretanto, aflatoxina B1 como carcinógeno iniciante ao invés de DEN. De acordo ainda com esses autores, a vitamina A não apresentou qualquer efeito preventivo nessas condições experimentais (GRADELET *et al.*, 1997; 1998).

2.6.3.3 Mecanismos de Ação do β -caroteno Envolvidos com a Carcinogênese

Foram propostos, até o momento, vários mecanismos que poderiam estar, eventualmente, envolvidos com a ação do β -caroteno na carcinogênese.

Assim, além da reconhecida função pró-vitâmica A do carotenóide, algumas observações fizeram com que se suspeitasse da existência de mecanismos intrínsecos de ação relacionados com a molécula intacta do carotenóide, como por exemplo: o fato de que a ingestão de vitamina A pré-formada não estava associada ao risco de câncer de pulmão, ao contrário do β -caroteno (PETO *et al.*, 1981); a observação de que o próprio carotenóide poderia se acumular em diversos tecidos (SHAPIRO *et al.*, 1984); e a constatação de que carotenóides tais como a cantaxantina, que não apresentam atividade pró-vitâmica A, também demonstravam ação anti-carcinogênica (MATHEWS-ROTH, 1982).

Descreveu-se, posteriormente, ação quimiopreventiva intrínseca do β -caroteno, tanto em modelos experimentais de carcinogênese *in vitro* (STICH e DUNN, 1986; PUNG *et al.*, 1988; ZHANG *et al.*, 1992) como *in vivo* (MORENO *et al.*, 1995a; KATSUMURA *et al.*, 1996; RIZZI *et al.*, 1997).

Desta forma, a bioconversão do carotenóide a retinóides e sua ação antioxidante, constituem, na verdade, os mecanismos de proteção mais aventados na literatura.

Portanto, sabe-se que a conversão metabólica do β -caroteno não apenas nas células do intestino e fígado, mas também possivelmente em outros tecidos (WANG *et al.*, 1991), resulta, em última instância, na produção dos ácidos retinóicos *todo-trans* e 9-*cis*, capazes de atuarem ao nível genômico através dos receptores nucleares para o ácido retinóico (RAR) e para o retinóide X (RXR), modulando as expressões de genes que podem estar, inclusive, envolvidos com processos como a proliferação e diferenciação celulares, importantes para o desenvolvimento da carcinogênese (MANGELSDORF *et al.* 1994; SILVEIRA e MORENO, 1998).

Além disso, como constituinte do sistema antioxidante do organismo, o β -caroteno pode atuar, em determinadas condições, como potente neutralizador de espécies reativas de oxigênio e sequestrador de radicais livres, principalmente a baixas pressões parciais de oxigênio, encontradas sob condições fisiológicas na maioria dos tecidos (BURTON e INGOLD, 1984). Assim, o carotenóide pode inibir a peroxidação lipídica no interior de membranas através de

bloqueio na propagação das reações de oxidação, reagindo preferencialmente com o oxigênio molecular singlete (1O_2) e com o radical peroxila ($ROO^\bullet$) (BURTON, 1989; ROUSSEAU *et al.*, 1992).

Descreveu-se, portanto, que o β -caroteno, como modulador do equilíbrio oxidativo do organismo, poderia inibir diversos processos oxidativos relacionados com a carcinogênese, principalmente em suas etapas de iniciação e promoção, sequestrando o oxigênio singlete e radicais livres envolvidos com a formação das neoplasias (PALOZZA e KRINSKY, 1992; ROUSSEAU *et al.*, 1992; SARKAR *et al.*, 1995a; SIES e STAHL, 1995).

Algumas referências na literatura indicam ainda a possibilidade do β -caroteno exercer uma eventual ação em nível genômico.

Assim, relatou-se uma ação indutora do carotenóide na expressão do gene que codifica para a proteína conexina 43, componente estrutural das junções tipo hiato, em fibroblastos de camundongo e seres humanos (ZHANG *et al.*, 1992; 1995). Descreve-se que estas junções, que se demonstrou estarem em número reduzido na carcinogênese (KRUTOVSKIKH *et al.*, 1995), estabelecem comunicações entre as células que possibilitam a passagem de sinais regulatórios do crescimento, dentre outros, envolvidos com o controle da proliferação tanto das células normais como neoplásicas (LÖWESTEIN e ROSE, 1992). Desta forma, relatou-se que o aumento do número das junções tipo hiato se correlaciona com a inibição do crescimento de células quimicamente transformadas, e que retinóides e carotenóides, incluindo o β -caroteno, são capazes de induzi-las (HOSSAIN *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1995; SIES e STAHL, 1997; STAHL *et al.*, 1997).

Além disso, descreveu-se que o β -caroteno pode reduzir a expressão de proto-oncogenes em linhagens celulares de neoplasias humanas ou papilomas cutâneos (SCHWARTZ *et al.*, 1993; KATSUMURA *et al.*, 1996) e do gene p53 mutante (SHKLAR e SCHWARTZ, 1994), bem como aumentar a expressão de proteínas do choque térmico e do fator α de necrose tumoral (TNF- α), estas últimas relacionadas à indução da morte celular programada (SCHWARTZ *et al.*, 1990; SCHWARTZ e SHKLAR, 1992; SHKLAR e SCHWARTZ, 1993; TOBA *et al.*, 1997).

Observou-se, ainda, em ratos submetidos à hepatectomia parcial como modelo experimental de proliferação celular, que o β -caroteno é capaz de inibir, através de mecanismos pós-transcricionais, a expressão do gene que codifica para a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCoA) redutase (EC 1.1.1.34) (MORENO *et al.*, 1995b), cuja atividade é considerada etapa crítica para o metabolismo intracelular não só do colesterol como ainda de outros derivados do mevalonato, que se relatou também estarem associados com a proliferação celular e a transformação maligna (BROWN e GOLDSTEIN, 1974; SOMA *et al.*, 1992; BENNIS *et al.*, 1993). Constatou-se, também mais recentemente, em cultura *in vitro* de linhagem de Macrófagos, que o β -caroteno é efetivamente capaz de inibir a síntese celular do colesterol a partir do [3H]acetato, mas não a partir do [^{14}C]mevalonato, o que indica que o carotenóide estaria atuando também nessas condições experimentais, através de um efeito inibidor na enzima HMGCoA redutase (FUHRMAN *et al.*, 1997).

Sugeriu-se que estas ações do β -caroteno em nível genômico poderiam ser mediadas, talvez, por uma nova classe de receptores nucleares, ou até mesmo por receptores da família RXR, com afinidade de ligação tanto para retinóides como para carotenóides (ZHANG *et al.*, 1992; ACEVEDO e BERTRAM, 1995; MORENO *et al.*, 1995a; NAVES e MORENO, 1998; SILVEIRA e MORENO, 1998).

Como mecanismos que poderiam estar eventualmente envolvidos com a ação protetora do carotenóide na carcinogênese, descreveu-se ainda sua capacidade de modular a atividade de enzimas relacionadas com a metabolização de xenobióticos (BASU *et al.*, 1987; EDES *et al.*, 1989; 1991; MANORAMA *et al.*, 1993; SARKAR *et al.*, 1994) ou do sistema de defesa antioxidante (SARKAR *et al.*, 1995; VAN LIESHOUT *et al.*, 1996; HE *et al.*, 1997), e de inibir a mutagenicidade e a ocorrência de lesões ou adutos do DNA (MUKHERJEE *et al.*, 1991;

KRINSKY, 1993; AIDOO *et al.*, 1995; RENNER, 1995; UEHARA *et al.*, 1996; POOL-ZOBEL *et al.*, 1997; SARKAR *et al.*, 1997), bem como a troca de cromátides irmãs, a formação de micronúcleos e de aberrações e translocações cromossômicas, que podem resultar da exposição de linhagens celulares a carcinogênicos (WEITBERG *et al.*, 1985; STICH e DUNN, 1986; KRINSKY, 1989b; SALVADORI *et al.*, 1992; KRINSKY, 1993; SARKAR *et al.*, 1997).

Relatou-se também que o β -caroteno pode estimular respostas imunes relacionadas com a prevenção do câncer, tais como a proliferação de linfócitos T e B, e a citotoxicidade de MACrófagos, de células "killer" naturais e de células T capazes de reconhecer e eliminar células neoplásicas, bem como a secreção de fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 alfa (IL-1- α), por células mononucleares do sangue periférico de humanos (TOMITA *et al.*, 1987; SHKLAR e SCHWARTZ, 1988; BENDICH, 1989; KRINSKY, 1989b; KRINSKY, 1991; ABDEL-FATTH *et al.*, 1993; SANTOS *et al.*, 1996; FERNANDES-CARLOS *et al.*, 1997; HUGHES *et al.*, 1997; KAZI *et al.*, 1997).

Finalmente, demonstrou-se ainda em alguns poucos modelos experimentais, a capacidade do β -caroteno de inibir a proliferação celular, tanto *in vitro* como *in vivo* (MURAKOSHI *et al.*, 1989; PHILLIPS *et al.*, 1993; TANAKA *et al.*, 1994; BIESALSKI e SCHÄFFER, 1997; GROSS *et al.*, 1997; PARK *et al.*, 1997), e de promover a diferenciação de células (NIKAWA *et al.*, 1995; BIESALSKI e SCHÄFFER, 1997; GROSS *et al.*, 1997; PARK *et al.*, 1997). Acredita-se que parte do efeito observado nestes casos possa ser atribuída à conversão metabólica do β -caroteno a retinóides ativos, e parte a uma ação intrínseca diretamente relacionada à molécula do carotenóide.

2.7 Retinóides

A "revolução dos retinóides" data do início deste século com a elaboração do papel nutricional da vitamina A (BOLLAG, 1996), que corresponde, na verdade, à primeira vitamina lipossolúvel a ser reconhecida, por MCCOLLUM e DAVIS (1913), a partir de experimentos conduzidos em ratos tratados com rações às quais se adicionou ou não, manteiga, extratos etéreos de gema de ovo, folhas de alfafa, fígado ou rim, que em muito melhoraram o crescimento dos animais.

Todavia, nosso conhecimento histórico a respeito desse composto retrocede, provavelmente, a uns 3500 anos atrás. Assim, nesse sentido, já constam, inclusive, menções nos papiros de KAHUN (ca. 1825 a.C.) e de EBERS (ca. 1500 a.C.), a tratamentos de afecções oculares através da ingestão de fígado cru ou aplicação tópica de extratos de fígado de boi, respectivamente. Além disso, existem evidências de que o primeiro reconhecimento indiscutível da cegueira noturna ocorreu na Grécia antiga, já havendo HIPÓCRATES (460-327 a.C.) descrito a "nictalopia" em seu segundo livro, denominado "Prognóstico" (WOLF, 1996).

Entretanto, não foi senão em 1931, que KARRER e colaboradores (1931) descreveram o isolamento e caracterização da estrutura química da vitamina A.

O termo retinóide, introduzido por SPORN e colaboradores (1976), se refere, na verdade, a uma família de substâncias que inclui a vitamina A (retinol) e seus derivados metabólicos naturais, o retinaldeído e o ácido retinóico, bem como inúmeros outros derivados sintéticos (IUPAC-IUB, 1982).

A vitamina A consiste em um álcool primário de cadeia longa e que pode se apresentar em uma série de formas isoméricas. Na natureza ocorre, em geral, como retinol na sua forma todo-*trans*, e com três características estruturais importantes, ou seja, apresentando: (i) um anel β -ionona, sua extremidade hidrofóbica; (ii) uma cadeia lateral isoprenóide conjugada, que está

sujeita à isomerização na presença de luz; e (iii) um grupamento terminal polar, que pode ser modificado enzimática ou quimicamente para se tornar um éster, como por exemplo no caso do palmitato de retinila, ou um aldeído, como no retinaldeído, ou até mesmo ser oxidado a um metabólito polar, como no caso do ácido retinóico (ROSS, 1993; BASU e DICKERSON, 1996b).

Na maior parte dos tecidos de animais o retinóide predominante é o palmitato de retinila, embora também possam ocorrer outros ésteres de ácidos graxos, tais como o oleato ou estearato de retinila. A maioria desses metabólitos também ocorre na configuração *trans*. Além disso, a forma aldeídica 11-*cis*, ou seja, o 11-*cis* retinaldeído, e que constitui um cromóforo na retina do olho, bem como diversas formas ácidas, como por exemplo, os ácidos retinóicos *todo-trans*, 3,4-didesidro- e 9-*cis*, são metabólitos ativos do retinol, presentes na maioria, se não em todos os tecidos (BLOMHOFF, 1994).

É justamente a configuração estrutural da vitamina A que lhe confere determinadas propriedades físicas, importantes não só para a ação do próprio retinol em sistemas biológicos, como também de seus compostos relacionados.

Assim, por exemplo, devido à sua estrutura química a vitamina A sofre facilmente oxidação quando exposta ao ar, e isomerização quando exposta à luz. Além disso, suas propriedades estereoisoméricas são particularmente importantes, por exemplo, para a fisiologia da visão (WALD, 1960; DINGLE e LUCY, 1965; BASU e DICKERSON, 1996b).

Fontes importantes de vitamina A pré-formada na alimentação são constituídas exclusivamente por produtos de origem animal, como por exemplo, fígado, ovos e leite (OLSON, 1994b). Praticamente nenhum ou muito pouco ácido retinóico pré-formado é encontrado em uma alimentação normal (BLOMHOFF, 1994).

Define-se como uma unidade internacional (UI) de vitamina A, 0,3 μ g de retinol *todo-trans*. Por outro lado, do ponto de vista nutricional, considera-se mais adequado o termo "equivalentes de retinol" (ER), que converte todas as fontes alimentares de vitamina A e carotenóides em uma única unidade. Assim, assume-se, geralmente, que 1 μ g de retinol equivale biologicamente a 6 μ g de β -caroteno ou 12 μ g de uma mistura de carotenóides com atividade pró-vitamina A da alimentação (IUPAC-IUB, 1982; BLOMHOFF, 1994).

2.7.1 Absorção, Transporte, Metabolismo e Armazenamento de Retinóides Naturais

Após suas ingestões, alimentos contendo ésteres de retinila, isto é, vitamina A pré-formada, sofrem hidrólise no lúmen intestinal por duas enzimas pancreáticas, ou seja, pela hidrolase de ésteres de colesterol e pela lipase, com suas consequentes liberações e agregações em glóbulos de lipídeos (ERLANSON e BORGSTOM, 1968; SILVEIRA e MORENO, 1998).

Nesse sentido, foram ainda descritas no rato, e mais recentemente em seres humanos, duas outras enzimas presentes na membrana apical da bordadura em escova do enterócito também capazes de realizarem hidrólise dos ésteres de retinila, uma delas estimulada principalmente pelo sal biliar taurocolato, e atuando preferencialmente em ésteres de retinila de cadeia curta, e a outra, pelo sal biliar desoxicolato, agindo mais especificamente em ésteres de retinila de cadeia longa (RIGTRUP *et al.*, 1994).

A seguir, o retinol livre não-esterificado resultante pode ser absorvido pelos enterócitos por difusão passiva, quando presente no lúmen intestinal em concentrações elevadas, ou por mecanismo de difusão facilitada mediada por carregador, quando em concentrações fisiológicas (DEW e ONG, 1994).

Evidências demonstram que menos do que 75% do retinol ingerido são absorvidos, e que isto depende do tipo e quantidade de gordura presente na alimentação (BLOMHOFF *et al.*, 1991; BLOMHOFF, 1994).

No interior do enterócito, após sua absorção o retinol pode sofrer esterificação principalmente com ácidos graxos de cadeia longa tais como o ácido palmítico ou esteárico, através das atividades das enzimas lecitina:retinol aciltransferase (LRAT), que utiliza como fonte de ácido graxo o grupamento acila na posição *sn*-1 da fosfatidilcolina (MACDONALD e ONG, 1988), e da enzima acil:CoA retinol aciltransferase (ARAT), que, por sua vez, utiliza grupamentos acila livres (HELGERUD *et al.*, 1983).

Por outro lado, em sua forma livre descreveu-se que o retinol poderia ter efeitos deletérios nas células (ONG, 1994). Assim, tão logo no interior das mesmas este se liga com elevada afinidade a duas proteínas citoplasmáticas, ou seja, às proteínas ligadoras de retinol celular CRBP e CRBP II, que, apesar de apresentarem 56% de homologia entre suas sequências de aminoácidos, diferem, entretanto, em suas propriedades fisiológicas (ROSS, 1993; ONG, 1994).

Descreveu-se, ainda, que a proteína ligadora de retinol celular CRBP II se localiza exclusivamente no interior do enterócito, onde representa cerca de 1% da proteína citossólica, enquanto a CRBP pode ser encontrada em diferentes tecidos tais como na musculatura do intestino delgado, nos rins, testículos, pulmões e no fígado (CROW e ONG, 1985; WOLF, 1991; ROSS, 1993). Além disso, relatou-se que as duas proteínas, ou seja CRBP II e CRBP, são também capazes de se ligar ao retinaldeído, a primeira com a mesma afinidade que demonstra para com o retinol, e a segunda, sendo ainda capaz de se ligar ao isômero 13-*cis* do retinol e ao 3-desidroretinol. Todavia, este aldeído pode deslocar o retinol apenas de sua ligação com a CRBP II (MACDONALD e ONG, 1987).

No interior do enterócito o retinol ligado à CRBP II sofre esterificação principalmente pela ação da enzima LRAT. Entretanto, quando presente em altas concentrações intracelulares o retinol satura esta proteína ligadora, sendo, então, esterificado pela enzima ARAT (BLOMHOFF *et al.*, 1991).

A seguir, os ésteres de retinila sintetizados são incorporados em quilomícrons. Estes são transferidos para o sistema linfático por exocitose, atingindo a circulação sistêmica, onde são metabolizados em remanescentes de quilomícrons, e retomando ao fígado restando a maior parte dos ésteres de retinila que carregam (HENDRIKS, 1996; GERSTER, 1997b). Estes remanescentes parecem ser também importantes para a liberação direta de retinol em tecidos extrahepáticos caracterizados por intensa proliferação celular e diferenciação tais como o baço e a medula óssea, bem como para o pulmão, rim, tecido adiposo, musculatura esquelética e leucócitos da periferia (BLOMHOFF *et al.*, 1990a; BLOMHOFF, 1994; GERSTER, 1997b). Por outro lado, o ácido retinóico, produto de oxidação do retinaldeído, é absorvido diretamente para o sistema tributário da veia porta, sendo transportado no sangue ligado à albumina (BLOMHOFF *et al.*, 1990a).

Portanto, cerca de 70 a 80% dos ésteres de retinila presentes nos remanescentes de quilomícrons são captados pelo fígado, onde se descreveu a presença de dois diferentes tipos de células particularmente envolvidas com o metabolismo da vitamina A, ou seja, as assim chamadas células perissinusoidais estreladas, ou de Ito, responsáveis pelo armazenamento do retinol na forma de ésteres especialmente na região periportal, e os hepatócitos, diretamente envolvidos com a captação dos remanescentes de quilomícrons e com a síntese e secreção da proteína ligadora de retinol (RBP), uma proteína de 21 kDa com 182 resíduos de aminoácidos e apenas um sítio de ligação para o retinol (BATRES e OLSON, 1987; BLOMHOFF *et al.*, 1991).

Acreditava-se até há não muitos anos atrás que os hepatócitos constituíam o principal, se não o único, sítio de síntese de RBP. Entretanto, sabe-se agora que células de muitos outros tecidos apresentam mRNA para RBP, ou seja, parecem também sintetizar essa proteína (SOPRANO *et al.*, 1986; BLOMHOFF, 1994).

No interior dos hepatócitos os ésteres de retinila são subsequentemente hidrolizados, possivelmente pelas enzimas retinil éster hidrolase ácida e neutra presentes na membrana plasmática e/ou endossomos, e o retinol formado é transferido para o retículo endoplasmático, onde se liga à RBP para posterior secreção para o exterior da célula (RONNE *et al.*, 1983; GAD e HARRISON, 1991; BLOMHOFF, 1994). A interação do retinol com a RBP (holo-RBP) serve para solubilizar a vitamina no sangue e proteger a molécula de retinol contra eventual alteração oxidativa (BASU e DICKERSON, 1996b). Entretanto, antes de ser liberado para a circulação sistêmica o complexo retinol-RBP se associa, no lúmen do retículo endoplasmático, a uma proteína homotetramérica de 55 kDa sintetizada pelo fígado e que também apresenta um sítio de ligação com elevada afinidade pela tiroxina, a transtiretina (TTR), previamente conhecida como pré-albumina, que reduz sua filtração glomerular (BLOMHOFF *et al.*, 1991; HENDRIKS, 1996).

A molécula de retinol circula diversas vezes entre o fígado e os tecidos extrahepáticos, antes de ser irreversivelmente degradada. Como a meia-vida da RBP no plasma é menor do que a do retinol, isto implica, entretanto, na necessidade de síntese adicional de RBP para que ocorra recirculação de vitamina A (LEWIS *et al.*, 1990; ROSS, 1993).

Assim, o complexo retinol-RBP liberado pelos hepatócitos tem a função básica de satisfazer as necessidades de vitamina A do organismo, sendo o restante armazenado nas células perissinusoidais estreladas, que contêm cerca de 80-90% do total hepático de retinol, principalmente na forma de ésteres de retinila (BATRES e OLSON, 1987; BLOMHOFF e WAKE, 1991).

Os mecanismos através dos quais as células captam o retinol presente no complexo retinol-RBP-transtiretina são ainda controversos (ROSS, 1993; HENDRIKS, 1996; SILVEIRA e MORENO, 1998), tendo-se demonstrado que isto pode ocorrer com (SMELAND *et al.*, 1995) ou sem (NOY e XU, 1990; NOY e BLANER, 1991) a presença de receptores específicos para a RBP, presentes nas membranas plasmáticas.

De uma forma geral, cerca de 10-20% da vitamina A ingerida na alimentação não são absorvidos. Do restante, aproximadamente 20% aparecem nas fezes através da bile, 17% são excretados na urina, 3% são expirados como CO₂ e 40-50% são armazenados no organismo, primariamente no fígado (BASU e DICKERSON, 1996b).

Portanto, a ingestão de retinol em excesso por períodos prolongados pode causar lesão hepática, tendo-se sugerido que a toxicidade da vitamina A pode ser devida à sua elevada concentração excedendo a capacidade de ligação da molécula de RBP, ou de CRBP, com consequente precipitação do retinol e alteração na estrutura e função normal das membranas celulares (BLOMHOFF, 1994; LETTINGA *et al.*, 1996). Um outro eventual mecanismo que poderia ser responsável pela toxicidade seria através da interação dos retinóides com seus respectivos receptores nucleares (SILVEIRA e MORENO, 1998).

Da mesma forma que no intestino delgado, o retinol ligado à CRBP pode ser esterificado no fígado, pelas enzimas LRAT e ARAT (BLOMHOFF *et al.*, 1991). Além disso, descreveu-se que a CRBP está também envolvida com a conversão do retinol hepático em ácido retinóico, que em elevadas concentrações pode inibir a conversão da vitamina A em retinaldeído, além de estimular a síntese de ésteres de retinila (NAPOLI, 1993; WANG *et al.*, 1993).

Assim, no interior das células o retinol pode ser armazenado na forma de ésteres de retinila, pode ser reciclado novamente para a circulação sistêmica ou ser oxidado a ácido retinóico, o que envolve, inicialmente, a oxidação da vitamina A em retinaldeído, através das atividades das enzimas álcool desidrogenase e retinol desidrogenase (BLOMHOFF, 1994; SILVEIRA e MORENO, 1998).

Observou-se que o retinaldeído, por sua vez, pode ser oxidado a ácido retinóico pela enzima retinaldeído desidrogenase e membros da família do sistema citocromo P450, ou seja, as suas formas 1A1 e 1A2, e que diversas outras isoenzimas desse sistema podem participar, a

seguir, do metabolismo do ácido retinóico, produzindo compostos polares tais como os ácidos retinóicos 4-OH e 18-OH, que serão posteriormente excretados na urina ou conjugados no fígado com o ácido glicurônico, com subsequente excreção biliar na forma de glicuronídeos (ROBERTS *et al.*, 1992; ROSS, 1993; EL-AKAVI e NAPOLI, 1994; DUESTER, 1996).

Diversos desses compostos, apesar de constituírem metabólitos do ácido retinóico, apresentam ainda atividade biológica. Relatou-se ainda que o principal destes glicuronídeos, o retinóil β -glicuronídeo é capaz de estimular o crescimento de animais deficientes em vitamina A e induzir *in vitro* e *in vivo* a diferenciação de células epiteliais (FORMELLI *et al.*, 1996; BARUA, 1997).

O ácido retinóico *todo-trans* pode também dar origem no organismo ao isômero 9-*cis*, que se liga com elevada afinidade aos receptores nucleares para retinóides, capazes de regular respostas celulares. Discute-se, entretanto, se este processo de isomerização ocorre espontaneamente ou através de atividade enzimática (NAPOLI, 1996a; 1996b; MERTZ *et al.*, 1997).

Relatou-se, ainda, que as células de diferentes tecidos tais como do fígado, cérebro, ovário, testículos, útero e rins sintetizam uma proteína que se liga ao ácido retinóico celular (CRABP), e que tem afinidade de ligação principalmente pelo isômero *todo-trans*, mas que também é capaz de se ligar a seus isômeros 9-*cis* e 13-*cis*, bem como a seu metabólito polar, o ácido 4-OH-retinóico (FIORELLA e NAPOLI, 1994). Apesar de sua verdadeira função não estar ainda devidamente esclarecida, sugeriu-se que esta proteína talvez pudesse estar envolvida com o transporte do ácido retinóico do citossol para o núcleo ou, até mesmo, que estivesse mais diretamente relacionada com a homeostase do ácido retinóico no interior da célula, sequestrando-o e limitando sua distribuição e efeitos biológicos (ROSS, 1993; NAPOLI *et al.*, 1995).

Além disso, descreveu-se a existência de uma outra proteína celular com afinidade de ligação pelo ácido retinóico, a CRABP II, com propriedades semelhantes às da CRABP, e detectável durante a embriogênese, mas cuja localização se restringe à pele, em adultos (ASTRÖM *et al.*, 1991).

2.7.2 Propriedades Biológicas dos Retinóides Naturais

Reconhece-se, há muitos anos, que a vitamina A é um nutriente essencial a animais, necessário à espermatogênese e ao desenvolvimento embrionário adequados, à promoção do crescimento de uma forma geral, e à manutenção da integridade do sistema imune e da função visual, bem como da proliferação celular e diferenciação normais (OLSON, 1994c; SPORN *et al.*, 1994).

Com o decorrer do tempo, tornou-se também claro que não só o retinol, como também outros retinóides naturais podem apresentar propriedades biológicas específicas. Assim, sabe-se que o retinol, retinaldeído e ésteres de retinila, que são interconvertíveis, desempenham papéis na visão e espermatogênese (OLSON, 1994c; SPORN *et al.*, 1994; BARUA, 1997). Em contrapartida, a forma ácida da vitamina A, ou seja, o ácido retinóico, pode substituir a vitamina A quanto a seus papéis no crescimento e desenvolvimento, mas não é ativo na visão e reprodução (BASU e DICKERSON, 1996b).

A falta de ácido retinóico pode causar sintomas de deficiência de vitamina A, mas seu excesso pode ser tóxico ao organismo. Da mesma forma, a deficiência de vitamina A pode resultar em enfermidades, cegueira e até morte, e seu excesso culminar em hipervitaminose, bem como em teratogenicidade (OLSON, 1994c; SPORN *et al.*, 1994).

Assim, diversos estudos demonstraram que a vitamina A é necessária ao crescimento e desenvolvimento normais, e sua deficiência se expressa após poucas semanas, em porcos, gatos, galináceos e outras espécies de animais, como anorexia seguida de rápida perda de peso e interrupção no crescimento (GERSTER, 1997b).

No olho a vitamina A tem uma ação específica, altamente complexa, para a visão no escuro. Associado à proteína opsina, o isômero 11-*cis* do retinaldeído, derivado natural da vitamina A, forma a rodopsina, um pigmento visual sensível à luz localizado nos bastonetes da retina. Após exposição à luz os pigmentos visuais se desintegram liberando sinais de energia que se traduzem na imagem visual, formado-se, a seguir, no ciclo da visão, nova rodopsina. Um dos primeiros sinais da deficiência de vitamina A é a nictalopia (cegueira noturna) ou menor capacidade visual à luz difusa (SPORN *et al.*, 1994; BASU e DICKERSON, 1996b; GERSTER, 1997b).

Outra propriedade biológica importante da vitamina A é seu papel no controle da proliferação celular e diferenciação. Há muitos anos sabe-se, por exemplo, que sua deficiência resulta em queratinização de epitélios ciliares secretantes de muco e em outras alterações epiteliais, inclusive metaplasias semelhantes àquelas causadas por carcinogênicos químicos, em tecidos sensíveis como os da traquéia, pele, glândula salivar, córnea e testículos (BASU e DICKERSON, 1996b; DE LUCA *et al.*, 1997; GERSTER, 1997b).

No olho, lesões da conjuntiva e da córnea, tais como a xerose, manchas de Bitot, erosões e, finalmente, a cegueira, resultam de alterações na diferenciação do epitélio superficial (BASU e DICKERSON, 1996b).

Alterações na divisão e diferenciação celulares podem também afetar células-mãe ("stem cells"), resultando, por exemplo, em deficiência de hematopoiese. A deficiência de vitamina A está então frequentemente associada com anemia, caracterizada por ferro sérico reduzido, baixa capacidade de ligação do ferro, mas deposição aumentada desse mineral no fígado. Esta responde prontamente à suplementação com vitamina A (GERSTER, 1997b).

Da mesma forma, a deficiência de vitamina A pode resultar em alterações na imunidade, tanto humoral como celular, bem como em respostas anormais de reparo tecidual, com consequente aumento da severidade de infecções (ROSS, 1992; ROSS e STEPHENSEN, 1996).

Acredita-se que essa grande diversidade de efeitos biológicos dos retinóides seja em parte mediada, em última instância, por proteínas receptoras nucleares que fazem parte da numerosa família de receptores para os hormônios esteróides e tireoidianos, bem como para a vitamina D, e que atuam como fatores de transcrição modulando a expressão gênica (EVANS, 1988; MANGELSDORF, 1994; SILVEIRA e MORENO, 1998).

Essa nova era da pesquisa em vitamina A teve seu início ao final da década de 80 deste século, por ocasião do descobrimento quase que simultâneo, por dois grupos independentes de pesquisa, um liderado por P. CHAMBON em Strasbourg (França) e o outro por R. M. EVANS em San Diego (EUA), da existência de receptores nucleares para o ácido retinóico (KASTNER *et al.*, 1994; MANGELSDORF *et al.*, 1994; WOLF, 1996).

Estes atuam como fatores de transcrição dependentes de seus ligantes, e são estruturalmente semelhantes, apresentando uma região A/B próxima à extremidade amino-terminal da proteína, importante para a ativação da transcrição, uma região C contendo dois motivos ligadores de zinco envolvidos com a ligação do receptor a sequências específicas do DNA, e uma região E próxima à extremidade carboxila-terminal, responsável pela ligação do receptor a seu ligante e para a formação de dímeros. As funções das regiões D e F desses receptores não foram, entretanto, ainda suficientemente esclarecidas (LEID *et al.*, 1992).

Descreveu-se ainda a existência de dois tipos de receptores para retinóides, os assim chamados receptores RAR e RXR, com seus respectivos subtipos α , β e γ , todos codificados por genes individuais. Os receptores RAR podem se ligar ao ácido retinóico *todo-trans* e a seu isômero 9-*cis*, bem como ao 4-oxo-retinol, um metabólito da vitamina A, mas não apresentam, entretanto, afinidade pelo isômero 13-*cis* do ácido retinóico. Já os receptores RXR apresentam afinidade pelo isômero 9-*cis* do ácido retinóico, mas não pelo isômero *todo-trans* (GUDAS, 1994; MANGELSDORF, 1994).

Além dos isômeros *todo-trans* e *9-cis* do ácido retinóico, os receptores RAR e RXR podem se ligar com diferentes graus de seletividade, a uma variedade de retinóides sintéticos (LOTAN *et al.*, 1995).

Estes receptores variam em termos de suas distribuições nos vários tecidos durante o desenvolvimento e na vida adulta, tendo-se, portanto, sugerido que podem apresentar funções distintas na regulação da transcrição gênica. Desta forma, observou-se, por exemplo, expressão dos genes que codificam para os receptores RAR α e RXR β em diversos tecidos de embriões e animais adultos, enquanto a expressão do gene para o receptor RAR β foi detectada nos rins, músculo e próstata de animais adultos (LEID *et al.*, 1992; MANGELSDORF, 1994). Por outro lado, constatou-se expressão do gene que codifica para o receptor RAR γ na pele, o que sugere seu envolvimento na morfogênese e diferenciação epitelial (RUBERTE *et al.*, 1990).

Além disso, relatou-se em um estudo *in vitro* em células F9, em que se realizou mutação no gene para o receptor RAR γ , perda da expressão de genes que respondem a retinóides, tais como dos genes para as proteínas Hoxa-1, Hoxa-3, laminina B1 e colagenase IV, bem como redução no metabolismo do ácido retinóico *todo-trans* a seus derivados polares. Nesse mesmo estudo, a realização de mutação no gene para o receptor RAR α resultou em aumento do metabolismo do retinóide e redução na expressão dos genes para CRBP II e Hoxb-1, o que indica que cada subtipo de receptor pode apresentar uma função específica na modulação da expressão gênica (BOYLAN *et al.*, 1995).

Genes da família *Hox* codificam para proteínas que atuam como fatores de transcrição, e cujas expressões estão envolvidas com o desenvolvimento embrionário adequado (MARSHALL *et al.*, 1996).

Observou-se, ainda, que estes receptores nucleares para retinóides podem modular a transcrição ligando-se como dímeros a sequências nucleotídicas específicas presentes nos elementos de resposta de seus genes alvos (MANGELSDORF, 1994).

Os receptores RXR são os únicos capazes de formar homodímeros (RXR-RXR), atuando nesta forma em genes tais como CRBP II e *apo A1*. Formam também heterodímeros com os receptores RAR (RXR-RAR), para a vitamina D (RXR-DR), para o hormônio tireoidiano (RXR-TR) e com o receptor proliferador de peroxissomos ativado (RXR-PPAR). Heterodímeros são mais estáveis que homodímeros e apresentam maior afinidade com regiões promotoras de genes presentes no DNA (MANGELSDORF, 1994; CHAMBON, 1996).

Descreveu-se, ainda, que o heterodímero RXR-RAR e o homodímero RXR-RXR reconhecem sequências específicas de nucleotídeos presentes em genes que respondem aos retinóides. Tais elementos consistem de três ou mais repetições da sequência de bases AGGTCA. As sequências do elemento de resposta para o ácido retinóico (RARE), ou seja, para o heterodímero RXR-RAR, encontram-se separadas por 2 ou 5 nucleotídeos (DR2 e DR5), sendo, inclusive, o espaçamento DR5 o mais frequente, enquanto que o elemento de resposta para o homodímero RXR-RXR (RXRE) reconhece essas mesmas sequências quando espaçadas por apenas 1 nucleotídeo (DR1) (MANGELSDORF, 1994). RAREs e RXREs são também capazes de se ligarem a complexos de homo ou heterodímeros de receptores nucleares órfãos tais como a proteína regulatória *apo A1* (ARP-1), receptores nucleares do hepatócito (HNF-4) e a proteína 3 *v-erbA*-relacionada (EAR 3) (NAKSHATRI e CHAMBON, 1994; CHAMBON, 1996; JIANG e SLADEK, 1997).

Entende-se por receptores órfãos aqueles membros da família de receptores para hormônios esteróides/tireoidianos/retinóides, para os quais ainda não se determinou um ligante específico (GUDAS, 1994).

Assim, observou-se que retinóides podem tanto estimular como inibir a transcrição gênica.

Exemplos de genes ativados pelo ácido retinóico e seus receptores, por processo denominado de *transativação*, são os genes que codificam para o hormônio do crescimento e a oxitocina, para enzimas como a fosfoenolpiruvato ou álcool desidrogenase e os genes para as proteínas CRBP e CRABP II, bem como para algumas proteínas constituintes da matriz extracelular, tais como determinadas collagenases e a laminina B (GUDAS *et al.*, 1994). Neste caso, estes podem atuar de forma direta sintetizando uma proteína após ligação dos receptores RAR ou RXR ao elemento de resposta do respectivo gene no DNA, ou indireta, produzindo um fator de transcrição que atuará, a seguir, nos genes alvos (SILVEIRA e MORENO, 1998).

Por outro lado, exemplos de genes cujas transcrições são inibidas por retinóides são os genes para os fatores de crescimento IGF-1 e TGF- α (GUDAS *et al.*, 1994), bem como o gene para a proteína Gla da matriz extracelular (KIRFEL *et al.*, 1997).

Descreveu-se, além disso, que as ações dos retinóides na transcrição gênica dependem das quantidades e tipos dos receptores presentes, da mesma forma que dependem das concentrações de seus ligantes. Assim, na presença de uma concentração reduzida do ácido retinóico 9-*cis* e/ou de grandes quantidades de receptores RAR, ocorre a formação preferencial do heterodímero RXR-RAR, que nessas condições pode, inclusive, se ligar ao elemento de resposta RXRE, inibindo a transcrição gênica, como por exemplo no caso da proteína CRBP II (MANGELSDORF *et al.*, 1991).

Relatou-se, ainda, que retinóides podem também atuar em nível pós-transcricional através do aumento da estabilidade (ZHOU *et al.*, 1994) ou meia-vida do RNA mensageiro (BEX *et al.*, 1995), e regulando o processamento de precursores de transcritos (JARROUS e KAEMPFER, 1994).

Além disso, através de um processo denominado de *transrepressão*, observou-se que retinóides podem inibir alguns oncogenes e collagenases, bem como o fator de crescimento TGF- β 1 através da interação dos receptores RAR e RXR com o complexo protéico AP-1, um dímero das proteínas codificadas pelos proto-oncogenes *fos* e *jun* em geral envolvido com o controle da proliferação celular e da inflamação, com consequente perda da capacidade desse fator de transcrição de se ligar a elementos de resposta de seus respectivos genes (SALBERT *et al.*, 1993; GUDAS *et al.*, 1994).

As regiões dos receptores para retinóides que contribuem para com o antagonismo da função do complexo AP-1 não são idênticas às aquelas envolvidas com a ativação transcricional (NAGPAL *et al.*, 1995).

2.7.3 Retinóides e Câncer

2.7.3.1 Estudos em Humanos

Devido a seu envolvimento com o controle da proliferação e diferenciação celular, há alguns anos tem havido bastante interesse em se esclarecer o papel da vitamina A na carcinogênese humana, tendo sido conduzidos, consequentemente, diversos estudos epidemiológicos observacionais que procuraram examinar a relação entre a ingestão de vitamina A e o risco para o câncer.

Entretanto, de uma forma geral, as evidências foram até o momento inconclusivas nesse sentido, não havendo, inclusive, muitas dessas investigações estabelecido distinções entre a ingestão de vitamina A pré-formada e a de carotenóides.

Assim, BJELKE (1975) foi o primeiro a relatar na literatura, evidências epidemiológicas sugestivas de que a vitamina A poderia ter um efeito protetor contra o câncer de pulmão, e que se

basearam em um inquérito enviado a 8278 noruegueses em que estes eram questionados a respeito de seus hábitos alimentares e de tabagismo, bem como em um índice de ingestão total de vitamina A calculado, a seguir, a partir do consumo de vegetais e laticínios referido por essa população.

Nos anos subsequentes, diversos outros estudos sugeriram que o maior consumo de vitamina A na alimentação poderia proporcionar proteção contra o câncer de pulmão.

Desta forma, dois anos após, em um estudo tipo caso-controle conduzido em mulheres chinesas de Singapura, observou-se a existência de uma associação inversa entre o consumo de hortaliças, ricas em carotenóides com atividade pró-vitáminica A, e o câncer de pulmão (MACLENNAN *et al.*, 1977).

Preparações farmacológicas de vitamina A também pareceram conferir algum benefício, ao se comparar suas utilizações entre 800 indivíduos recém diagnosticados como portadores de cânceres e 3.433 pacientes com condições não-malignas, observando-se nos homens, uma associação negativa entre o desenvolvimento de câncer e o uso frequente dos suplementos (SMITH e JICK, 1978).

Já no início dos anos 1980s, tornou-se evidente a existência de uma associação mais especificamente entre o β -caroteno e redução do risco para câncer de pulmão, mas não para o retinol.

Assim, em um estudo prospectivo conduzido em 1.954 homens de meia-idade e que foram seguidos por 19 anos, descreveu-se que a ingestão de β -caroteno na alimentação relacionava-se inversamente com a incidência de câncer de pulmão, antes e após ajuste para o consumo de cigarros. Por outro lado, não se observou nessa investigação, relação entre a ingestão de vitamina A pré-formada e o risco para câncer de pulmão (SHEKELLE *et al.*, 1981).

Em uma investigação realizada no Havaí em 102 mulheres e 230 homens portadores de câncer de pulmão, bem como em 268 mulheres e 597 homens controles, demonstrou-se ainda uma associação negativa claramente dose-dependente, entre a ingestão de β -caroteno na alimentação e o risco para o câncer de pulmão nos dois sexos. Não se observou, entretanto, associação entre o retinol e o câncer de pulmão (LE MARCHAND *et al.*, 1989).

Por outro lado, em um estudo conduzido em 106 pacientes portadores de câncer epidermóide de pulmão e 212 controles, observou-se que os consumos de vitamina A pré-formada e de β -caroteno estavam associados, de forma independente e significativa, a um menor risco de desenvolvimento dessa neoplasia (DARTIGUES *et al.*, 1990). Portanto, ao mesmo tempo que esta investigação confirmou o papel protetor do β -caroteno, também sugeriu, entretanto, que a vitamina A pré-formada exerce o mesmo efeito.

Mais recentemente, em uma revisão de estudos epidemiológicos observacionais publicados na literatura, descreveu-se que de sete investigações tipo caso-controle que avaliaram o risco para câncer de bexiga e a ingestão de vitamina A pré-formada na alimentação, quatro não observaram associação, duas constataram redução de risco e uma detectou aumento do mesmo, embora não-significante, o que talvez possa sugerir que a maior ingestão de retinol pode reduzir o risco para o câncer de bexiga. Todavia, relatou-se também nessa mesma revisão, que as evidências epidemiológicas publicadas até então na literatura, apontavam para o fato de não haver, possivelmente, uma relação entre a ingestão de vitamina A pré-formada na alimentação e os riscos para os cânceres de pulmão, estômago, mama e colo uterino (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997e).

Diversos estudos epidemiológicos comparativos demonstraram, ainda, a existência de uma associação entre as concentrações séricas reduzidas de retinol ou β -caroteno, e o desenvolvimento de câncer em numerosos sítios, incluindo o pulmão, cavidade oral/orofaringe, esôfago, trato gastrointestinal, próstata, colo uterino, ovário e mama. Em relação ao carotenóide, essas relações parecem preceder o desenvolvimento da moléstia. Entretanto, as evidências nesse sentido quanto ao

retinol são bem menos consistentes e, em alguns casos, as associações podem representar mais uma consequência do que a causa do câncer (HONG e ITRI, 1994).

Não existem também evidências consistentes até o momento de que a suplementação com retinol possa reduzir o risco de desenvolvimento de qualquer tipo de câncer. Ao contrário, no estudo CARET (β -Carotene and Retinol Efficacy Trial) de intervenção primária, conduzido em milhares de indivíduos com história prévia de tabagismo ou exposição ao asbesto no ambiente de trabalho, e aos quais se administrou diariamente 25.000 UI de retinol associadas a 30 mg de β -caroteno, descreveu-se um aumento significativo do risco para câncer de pulmão no grupo suplementado, em comparação ao grupo que recebeu apenas placebo (OMENN *et al.*, 1996).

Em contrapartida, relatou-se que no estudo Wittenoom, conduzido na Austrália, o câncer de pulmão foi menos frequente em trabalhadores de minas de asbesto que receberam retinol (palmitato de retinila 25.000 UI/dia), do que naqueles que receberam β -caroteno (30 mg/dia), embora a diferença não tenha alcançado significância estatística nesse caso (DE KLERK, 1998).

Já em duas investigações realizadas em Linxian, onde se procurou avaliar o efeito da suplementação com retinol (palmitato de retinila; 5000 UI/dia), em combinação com o zinco ou outras vitaminas e microelementos, na prevenção dos cânceres de estômago e esôfago, extremamente frequentes nas populações dessa região da China, não se constatou qualquer efeito benéfico por parte da vitamina A, até mesmo quando já existiam anteriormente deficiências nutricionais estabelecidas (BLOT *et al.*, 1993; LI *et al.*, 1993).

Dois outros estudos de intervenção conduzidos nos EUA descartaram um efeito benéfico do retinol (25.000 UI/dia) em relação ao carcinoma cutâneo de células basais. Observou-se, por outro lado, uma redução de 25% no risco de desenvolvimento do carcinoma de células escamosas, uma neoplasia mais agressiva que a anterior, em indivíduos que apresentavam risco moderado de desenvolvimento de carcinomas de pele, embora indivíduos com alto risco não tivessem apresentado qualquer benefício (LEVINE *et al.*, 1997; MOON *et al.*, 1997).

Deve-se ressaltar, entretanto, que apesar de bem projetados e conduzidos, esses seis estudos de intervenção primária tiveram suas limitações. Assim, por exemplo, nos estudos CARET e Wittenoom não foi possível a inclusão de grupos placebo. Todos os ensaios, exceto os de Linxian, foram interrompidos ou modificados antes do que inicialmente planejado. Além disso, estes foram conduzidos em indivíduos de alto-risco, o que impossibilita a extrapolação dos resultados obtidos para a população geral.

Quanto à prevenção do desenvolvimento de novos cânceres primários ou de recorrência, procurou-se avaliar na Itália, em 1993, o efeito adjuvante de altas doses de vitamina A em 307 pacientes portadores de câncer pulmonar grau I de células não-pequenas. Após a cirurgia, estes foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, um tratado com doses orais de palmitato de retinila (300.000 UI/dia) e o outro que não recebeu tratamento. Após 46 meses de seguimento, 37% dos indivíduos tratados e 48% dos não tratados apresentaram uma recorrência ou desenvolvimento de novos cânceres primários. Dezoito pacientes do primeiro grupo desenvolveram novos cânceres primários, enquanto isto ocorreu em 33 indivíduos do grupo controle. O início do desenvolvimento de novos cânceres primários foi ainda significativamente retardado no grupo tratado com a vitamina A (PASTORINO *et al.*, 1993).

Já em 1994, avaliou-se, nos EUA, a eficácia do acetato de retinila quando administrado em doses diárias de 5000 UI ou 40.000 UI combinadas com outras vitaminas ou o zinco, em reduzir recorrências de carcinomas da bexiga. Após 12 meses de tratamento, apesar da sobrevida ter sido semelhante nos dois grupos, as taxas gerais de recorrência foram de 80% no grupo tratado com baixas doses de vitamina A e de 40% no tratado com altas doses diárias (LAMM *et al.*, 1994).

Entretanto, descreveu-se que a vitamina A por via oral não foi capaz de aumentar a sobrevida de pacientes portadores de melanoma maligno cutâneo em sua fase inicial após

18 meses de tratamento (MEYSKENS *et al.*, 1994), nem de prevenir a recidiva ou desenvolvimento de novos cânceres primários de cabeça e pescoço (JYOTHIRMAYI *et al.*, 1996).

Por outro lado, em se tratando de lesões pré-neoplásicas, relatou-se que tanto a vitamina A como o β -caroteno foram capazes de reduzir a frequência de células exfoliadas da cavidade oral que apresentavam micronúcleos (STICH *et al.*, 1984a, 1984b; STICH e ROSIN, 1984), bem como de reverter e suprimir a leucoplaquia, uma condição pré-cancerosa frequentemente associada com o desenvolvimento do câncer oral (STICH *et al.*, 1988a, 1988b). Apesar do β -caroteno ter apresentado por si só alguma atividade, a combinação desse carotenóide com baixas doses de vitamina A foi mais efetiva (STICH *et al.*, 1988b, 1991).

Além disso, relatou-se que o tratamento de lesões pré-neoplásicas da pele com retinol (25.000 UI/dia), resultou em diminuição significativa na incidência de carcinomas de células escamosas, em comparação ao grupo controle (LOTAN, 1996).

Quando os estudos iniciais com a vitamina A foram conduzidos, doses terapêuticas resultaram entretanto na síndrome da hipervitaminose A aguda, fazendo com que as atenções e esforços se focalizassem na síntese de derivados menos tóxicos do retinol.

Nesse sentido, o primeiro desses compostos a ser sintetizado, e que também constitui um derivado natural da vitamina A, foi o ácido retinóico *todo-trans*. Descreve-se que os ácidos retinóicos *todo-trans* e *13-cis*, bem como a 4-hidroxifenil retinamida (4-HPR), podem ser considerados, hoje em dia, como retinóides de primeira geração. Já os retinóides de segunda geração são constituídos por compostos aromáticos do tipo etretinato e seu principal metabólito, a atretina. Mais recentemente, foram também utilizados retinóides de terceira geração em ensaios clínicos, os assim chamados arotinóides, uma classe de compostos retinóides poliaromáticos (HONG e ITRI, 1994).

Desta forma, observou-se nos últimos anos que uma série de isômeros e derivados sintéticos do ácido retinóico apresentou atividade na quimioprevenção e no tratamento de lesões pré-neoplásicas, bem como na terapêutica de algumas formas de câncer, especialmente na leucemia promielocítica aguda (HONG e ITRI, 1994; WOLF, 1996; SILVEIRA e MORENO, 1998).

Assim, evidências clínicas têm demonstrado, por exemplo, a eficácia do ácido retinóico *todo-trans* no tratamento de lesões pré-neoplásicas da pele ou do colo uterino, e do ácido retinóico *13-cis* na prevenção de lesões pré-neoplásicas da laringe e do câncer de pele em pacientes com xeroderma pigmentoso, bem como nos tratamentos da leucoplaquia oral (LIPPMAN *et al.*, 1995) e do carcinoma avançado de células escamosas da pele, do carcinoma de células escamosas do colo uterino, e em cânceres de cabeça e pescoço (GUDAS, 1992; HONG e ITRI, 1994; LIPPMAN *et al.*, 1995; LOTAN, 1996; HONG e SPORN, 1997).

Da mesma forma, em estudo recente conduzido em 89 pacientes que foram seguidos por um período aproximado de 38 meses, descreveu-se que a administração por via oral de um retinóide acíclico, o ácido poliprenóico, foi capaz de reduzir significativamente a incidência de novos carcinomas hepatocelulares, após injeção percutânea com etanol ou ressecção cirúrgica do câncer primário (MUTO *et al.*, 1996).

2.7.3.2 Estudos *in vitro* e em Animais de Experimentação

A base racional para a utilização de retinóides como agentes quimiopreventivos ou na terapia do câncer começou a ser estabelecida há praticamente oito décadas, quando se observou que a deficiência de vitamina A poderia resultar em metaplasias nos epitélios dos

tratos respiratório, gastrointestinal e urinário (MORI, 1922; WOLBACH e HOWE, 1925), bem como no desenvolvimento de carcinomas de estômago em ratos (FUJIMAKE, 1926).

Entretanto, não foi senão mais recentemente, inclusive com a descoberta da ação anticarcinogênica da vitamina A (SAFFIGTTI *et al.*, 1967), que houve grande impulso na pesquisa dessa área do conhecimento (WOLF, 1996).

Estudos *in vitro* demonstraram, principalmente a partir dos anos 1970s, que retinóides podem reverter alterações pré-malignas dos epitélios de traquéia de "hamster" e de glândulas da próstata ou mamárias de camundongo em culturas de órgão, bem como suprimir a transformação maligna de inúmeras linhagens de células, induzida por carcinogênicos virais, físicos ou químicos (MOON *et al.*, 1994; LOTAN, 1996).

Da mesma forma, inúmeros estudos avaliaram nos últimos anos a ação quimiopreventiva ou terapêutica dos retinóides, em vários modelos de carcinogênese que utilizavam animais de experimentação. Logo de início empregou-se mais frequentemente retinóides de ocorrência natural, tais como o retinol e os ácidos retinóicos *todo-trans* e 13-*cis*. Todavia, com o aumento da disponibilidade de retinóides sintéticos, vêm sendo testados compostos mais ativos e que apresentam, inclusive, menos toxicidade.

Assim, em modelo de carcinogênese mamária induzida pela administração de DMBA observou-se, por exemplo, ainda em 1976, uma redução de 52% na incidência de cânceres de ratos tratados diariamente com acetato de retinila, em comparação a animais que receberam somente placebo em suas rações (MOON *et al.*, 1976). Estudos subsequentes não apenas confirmaram esses resultados, como também demonstraram uma ação inibitória da vitamina A no modelo de carcinogênese mamária induzida pela aplicação de MNU. Observou-se ainda que a vitamina A foi também capaz de prevenir a ocorrência de novas neoplasias mamárias, após remoção cirúrgica do câncer primário (MOON e MEHTA, 1990).

Mais recentemente, demonstrou-se que o ácido retinóico 9-*cis* apresentou maior efeito inibitório do que o isômero *todo-trans*, em modelo de carcinogênese mamária induzida pela MNU em ratos, sendo particularmente efetivo se combinado com o tamoxifeno ou raloxifeno, moduladores seletivos de receptores para estrógenos (ANZANO *et al.*, 1994; 1996; HONG e SPORN, 1997).

De uma forma geral, tais estudos indicaram que durante o processo de carcinogênese mamária existe um período ideal em que as células respondem ao tratamento com os retinóides, e de que estes são mais eficazes se administrados de forma contínua, principalmente durante as etapas de promoção e progressão (MOON *et al.*, 1994; LOTAN, 1996).

Descreveu-se ainda que a administração de vitamina A, bem como dos ácidos retinóicos *todo-trans* e 13-*cis*, principalmente durante a etapa de promoção, foi também capaz de inibir a formação de papilomas cutâneos em modelo de carcinogênese de pele induzida pelo DMBA em camundongos, com ou sem a aplicação concomitante de um agente promotor como o éster de forbol ou a antralina, antrona ou o ácido ocadáico (DAVIES, 1967; DAWSON, 1987; LOTAN, 1996; DE LUCA *et al.*, 1997).

Resultados conflitantes foram, entretanto, descritos em relação aos efeitos de retinóides na fotocarcinogênese, em que papilomas e carcinomas da pele são induzidos pela radiação UV-B. Na verdade, diversos estudos nos anos 1970s e 1980s observaram nesse modelo, aumento da carcinogênese quando o ácido retinóico foi aplicado topicamente ou administrado por via oral (MOON *et al.*, 1994; LOTAN, 1996). Todavia, em estudo mais recente observou-se nesse tipo de modelo em camundongos, supressão da conversão de papilomas em carcinomas pela aplicação tópica de ácido retinóico *todo-trans* (ATHAR *et al.*, 1991).

Demonstrou-se também que o ácido retinóico 13-*cis* foi capaz de inibir a carcinogênese oral em três diferentes modelos experimentais, ou seja, as carcinogêneses induzidas na bolsa

facial e na língua de "hamsters" pela aplicação de DMBA, e a induzida na cavidade oral de camundongos pela administração de óxido de nitroquinolina (LOTAN, 1996).

Além disso, observou-se que os ácidos retinóicos *todo-trans* e 13-*cis*, bem como diversas retinamidas, incluindo a 4HPR, além de suprimirem a atipia histológica de lesões uroteliais, também reduziram a incidência, o número e a severidade de carcinomas de bexiga induzidos pela administração intragástrica de *N*-butil-*N*-(hidroxibutil) nitrosamina em ratos ou camundongos. A maioria dos retinóides efetivos reduziu o aparecimento das neoplasias, suprimindo a progressão de lesões uroteliais a carcinomas de rápido crescimento (MOON *et al.*, 1994; LOTAN, 1996).

Relatou-se, ainda, que o acetato de retinila foi capaz de inibir a carcinogênese vesical induzida pela suplementação de rações de camundongos com o carcinogênico *N*-(4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil)formamida, e de reduzir a incidência de adenomas e carcinomas pancreáticos em ratos tratados com rações suplementadas com azasserina, ou o número de adenomas presentes no cólon de ratos expostos à DMH (MOON *et al.*, 1994; LOTAN, 1996).

Descreveu-se também ainda recentemente, que o ácido retinóico 9-*cis* e a 4HPR reduziram a proliferação celular e preveniram a formação de lesões pré-neoplásicas e de cânceres, em ratos tratados com azoximetano como carcinogênico indutor da carcinogênese de cólon (ZHENG *et al.*, 1997).

2.7.3.2.1 Retinóides e Hepatocarcinogênese Experimental

Quanto aos poucos estudos descritos na literatura a respeito dos efeitos de retinóides na hepatocarcinogênese, seus resultados têm sido também muitas vezes conflitantes.

Investigações conduzidas nos anos 1970s em ratos submetidos a modelo que empregava aflatoxina B1 como hepatocarcinogênico, demonstraram, inicialmente, que tanto a administração de palmitato de retinila como a de acetato de retinila não foram capazes de inibir o desenvolvimento de cânceres hepáticos (NEWBERNE e ROGERS, 1973b; NEWBERNE e SUPHAKARN, 1977).

Mais recentemente demonstrou-se, entretanto, que ratos expostos a diferentes doses do hepatocarcinogênico 3'-MDAB na ração e tratados com rações suplementadas com acetato de retinila (1 mmol/kg), não apresentaram nódulos hepáticos observáveis, ao contrário dos animais do grupo controle, cujos fígados foram bastante comprometidos por essas lesões pré-neoplásicas (MACK *et al.*, 1990).

Por outro lado, relatou-se, a seguir, que a administração intraperitoneal intermitente de retinol em diferentes dosagens (6,25; 12,5 e 25 mg/rato) durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese induzida pelo carcinogênico 3'-MDAB resultou em aumento moderado, mas não significativo, no desenvolvimento de cânceres hepáticos em ratos (OHKAWA *et al.*, 1991).

Em camundongos C₃H-A^y fêmeas tratados com rações suplementadas com acetato de retinila observou-se, por sua vez, redução dose-dependente na incidência de hepatomas espontâneos (MAIORANA e GULLINO, 1980), ao contrário de camundongos submetidos a modelo de hepatocarcinogênese induzida pela aplicação de DEN e tratados com ácido retinóico *todo-trans* ou retinamidas, que apresentaram aumento no número de carcinomas hepatocelulares (MCCORMICK *et al.*, 1990).

Em contraste, constatou-se ao final de um outro estudo que 90% dos ratos alimentados com rações contendo o carcinogênico 3'-MDAB desenvolveram cânceres hepáticos, enquanto isto ocorreu em apenas 11% dos animais que receberam a mesma ração suplementada com o ácido retinóico 13-*cis* (DAOUD e GRIFFIN, 1980).

Da mesma forma, descreveu-se que injeções intramusculares de ácido retinóico todo-*trans* em ratos tratados com o carcinogênico *N*-nitrosomorfolina dissolvido na água dos bebedouros, resultaram em reduções significantes no número, e dimensões de lesões pré-neoplásicas positivas para a enzima γ GT, com concomitante aumento no número de lesões *myc* 110-negativas, sugerindo um efeito supressor desse retinóide na expressão do oncogene *myc* e na proliferação celular de lesões pré-neoplásicas hepáticas (BABA *et al.*, 1991).

Os resultados desse estudo estão de acordo com outra observação também conduzida em ratos, em que a suplementação das rações com palmitato de retinila foi capaz de reduzir o número e volume de lesões pré-neoplásicas induzidas nos animais por aplicação de dois diferentes agentes promotores durante 8 semanas consecutivas, em modelo de hepatocarcinogênese que utilizava DEN como agente iniciante (BERBERIAN *et al.*, 1995).

Em contrapartida, observou-se em nosso meio que ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH), que também utiliza a DEN como carcinogênico iniciante mas que não emprega agente promotor por tempo prolongado, e tratados concomitantemente com acetato de retinila por oito semanas consecutivas durante as fases de iniciação/seleção, apresentaram uma incidência de nódulos hepáticos de 100% e apenas uma diminuição moderada do número total dessas lesões pré-neoplásicas, em comparação a animais do grupo controle. Nessas condições experimentais, a administração de vitamina A também não reduziu significativamente o número e as dimensões de focos de hepatócitos marcados positivamente pela enzima γ GT (MORENO *et al.*, 1995a).

Além disso, descreveu-se posteriormente ainda em nosso meio, que ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH e tratados com acetato de retinila por cinco semanas consecutivas durante a fase de promoção inicial da carcinogênese, também não apresentaram reduções significantes nos números e dimensões das lesões pré-neoplásicas hepáticas, em comparação a animais do grupo controle (RIZZI *et al.*, 1997).

Quando administrada especificamente por oito semanas durante a fase de progressão observou-se recentemente, entretanto, que a vitamina A foi capaz de reduzir a incidência de hepatocarcinomas e nódulos persistentes de hepatócitos em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH (SILVEIRA, 1998).

2.7.3.3 Mecanismos de Ação dos Retinóides Envolvidos com a Carcinogênese

Até o presente foram aventados inúmeros mecanismos que poderiam estar relacionados com as ações da vitamina A e dos retinóides nas etapas da iniciação, promoção e progressão da carcinogênese (GUDAS *et al.*, 1994).

Assim, demonstrou-se que a vitamina A e outros retinóides podem inibir mutagênicos de ação direta, bem como a ativação metabólica de alguns carcinógenos químicos, que de outra forma interagiriam com o DNA lesando-o (LUPULESCU, 1993). Relatou-se, ainda, que os retinóides poderiam também induzir as atividades de enzimas relacionadas com a metabolização de compostos químicos (GUDAS *et al.*, 1994; WANG e HIGUCHI, 1995).

Estes efeitos poderiam ser, portanto, responsáveis pela atividade anticarcinogênica dos retinóides mais especificamente na fase de iniciação, embora se tenha descrito que estes compostos agem preferencialmente nas etapas mais tardias da carcinogênese, ou seja, na promoção e progressão (LUPULESCU, 1993; LOTAN, 1996).

A etapa de promoção envolve a expansão da população de células iniciadas para formar uma lesão pré-neoplásica, com subsequente progressão e conversão da mesma em uma neoplasia maligna. Estes processos estão associados, basicamente, com desregulação da

proliferação celular e diferenciação aberrante, bem como com perda da capacidade ou tendência diminuída das células sofrerem apoptose (LOTAN, 1996).

Desta forma, as evidências de que os retinóides podem também atuar de modo protetor na etapa da promoção ou progressão da carcinogênese se devem, basicamente, a diversas investigações que demonstraram as capacidades dessas substâncias de inibir a transformação *in vitro* de diversas linhagens celulares, de reverter lesões pré-neoplásicas em animais, e de suprimir a síntese do DNA, a proliferação celular e a angiogênese, além de induzir a diferenciação e a apoptose de células. Além disso, retinóides podem ainda alterar comunicações intercelulares do tipo hiato, inibir a produção de prostaglandinas, a indução da enzima ornitina descarboxilase ou a expressão de oncogenes como *c-fos* ou *c-myc* e fatores de crescimento do tipo TGF- α , bem como estimular a expressão de citocinas tais como o TGF- β , inibindo assim a carcinogênese (GUDAS *et al.*, 1994; LOTAN, 1996).

Quanto ao papel das prostaglandinas na carcinogênese, descreve-se que estas teriam potencialmente importância nas fases pós-iniciação, devido a seus papéis na modulação da vigilância imunitária (MARNETT, 1992) e pelo fato da hiperexpressão da enzima ciclooxigenase-2, que cataliza a síntese de prostaglandinas e a produção de radicais eletrofílicos mutagênicos, estar relacionada com uma inibição da apoptose em células epiteliais (TSUJII e DUBOIS, 1995). Portanto, inibidores dessa enzima teriam, teoricamente, um efeito anticarcinogênico, o que foi confirmado através da utilização de anti-inflamatórios não-esteroidais em modelos experimentais *in vivo* de carcinogênese de cólon, bem como em seres humanos (MARNETT, 1992; GIARDELLO *et al.*, 1993; HONG e SPORN, 1997).

Relatou-se ainda recentemente que retinóides tais como o acetato de retinila e o ácido retinóico, podem suprimir a indução da enzima ciclooxigenase-2 e a produção de prostaglandina E_2 , mediadas pelo agente promotor éster de forbol em células epiteliais da cavidade oral, sugerindo que estes efeitos poderiam estar também relacionados com suas atividades quimiopreventivas contra o câncer (MESTRE *et al.*, 1997).

Já a enzima ornitina descarboxilase, que cataliza a descarboxilação da ornitina em putrescina, desempenha importante papel na síntese de poliaminas e, portanto, na proliferação celular, podendo ser induzida por diversos fatores, incluindo a administração de agentes promotores do câncer. Nesse sentido, descreveu-se que retinóides podem reduzir sua atividade em diversas linhagens celulares e em modelos experimentais *in vivo*, o que também explicaria, ao menos em parte, os efeitos inibitórios desses compostos na etapa de promoção da carcinogênese (GUDAS *et al.*, 1994).

Entretanto, acredita-se hoje em dia que é, na verdade, a capacidade que os retinóides têm de modular a expressão gênica através de suas interações com receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição, a principal responsável por suas propriedades biológicas e atividades na carcinogênese.

Assim, existem inúmeras evidências de que alterações na estrutura, função e expressão dos próprios genes desses receptores nucleares para retinóides estão associadas com a carcinogênese.

Nesse sentido, demonstrou-se, por exemplo, há já alguns anos, a existência de alteração no gene para o receptor RAR α na leucemia promielocítica aguda, com a ocorrência de uma translocação cromossômica t(15;17) fundindo o gene *PML* do cromossomo 15 com o gene para o receptor RAR α localizado no cromossomo 17 (WARRELL *et al.*, 1993; SILVEIRA e MORENO, 1998) e, em um caso de carcinoma hepatocelular humano, alteração do gene para o receptor RAR β por integração do DNA do vírus da hepatite B (DEJEAN *et al.*, 1986).

Da mesma forma, demonstrou-se também uma redução nas expressões dos genes para os receptores RAR α e RAR γ na pele normal e em neoplasias cutâneas benignas de camundongos, induzida pela administração do agente promotor éster de forbol. Esta se associava, no caso, com uma

ativação concomitante do oncogene *v-ras^{ts}* e maior risco de conversão à malignidade (DARWICHE *et al.*, 1996). Já a introdução de um vetor recombinante de expressão do receptor $RAR\alpha$ em células de papiloma cutâneo resultou em inibição da proliferação celular, em resposta à administração de ácido retinóico (DARWICHE *et al.*, 1996; DE LUCA *et al.*, 1997).

Observou-se, ainda, concentrações reduzidas ou praticamente não-detectáveis do mRNA para o receptor $RAR\beta$ em muitas linhagens celulares epiteliais malignas derivadas, por exemplo, de carcinomas de pulmão (ZHANG *et al.*, 1994; 1996), de câncer epitelial ovariano (CALIARO *et al.*, 1994), de carcinomas do colo uterino (GEISEN *et al.*, 1997), de carcinomas de células escamosas da orofaringe (HU *et al.*, 1991) e de cânceres de mama (SWISSHELM *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1996), bem como redução do mRNA para $RAR\beta$ em carcinoma de células escamosas da região da cabeça e pescoço (XU *et al.*, 1994), em lesões pré-neoplásicas da cavidade oral (LOTAN *et al.*, 1995b) e em carcinomas de mama (XU *et al.*, 1997).

Redução de transcritos para o receptor $RAR\beta$ foi também constatada em linhagens de células de hepatoma, em comparação ao fígado adulto de rato. Isto sugere que o aumento da expressão para $RAR\beta$ esteja associado, no caso, à diferenciação ou maturação dos hepatócitos (WAN *et al.*, 1992).

Por outro lado, essas diversas observações sugerem, ainda, de uma forma geral que uma redução ou perda específica da expressão de determinado gene codificante para receptor nuclear de retinóide, como por exemplo do gene para o receptor $RAR\beta$, possa constituir evento importante no processo em múltiplas etapas da carcinogênese e contribuir para com a resistência a retinóides observada em certas células, e que estes poderiam representar, inclusive, anti-oncogenes (GERADTS *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1996; DE LUCA *et al.*, 1997; XU *et al.*, 1997).

As observações de que a transfecção de células de carcinoma epidermóide de pulmão humano com um plasmídeo de expressão do receptor $RAR\beta$ resultou em redução da carcinogenicidade em camundongos (HOULE *et al.*, 1993), e de que camundongos transgênicos que expressam um gene $RAR\beta$ anti-sentido desenvolveram cânceres pulmonares (BERARD *et al.*, 1996), bem como a constatação de que a transfecção de células de câncer de mama hormônio independente com o gene $RAR\beta$ resultou em recuperação da sensibilidade a retinóides por parte dessas células previamente deficientes nesse gene (ZHANG *et al.*, 1996), reforçam esta hipótese.

Além disso, que alterações na expressão do gene $RAR\beta$ podem ainda contribuir para o desenvolvimento de cânceres do colo uterino, foi também sugerido pela análise de híbridos formados entre células somáticas HeLa de carcinoma de colo uterino e células humanas normais. Assim, demonstrou-se que o tratamento com ácido retinóico resulta em potente indução na expressão do gene $RAR\beta$ em híbridos não-carcinogênicos entre células HeLa e células normais, mas não nas células HeLa parentais ou nos híbridos carcinogênicos (BAUST *et al.*, 1996).

De certo modo em concordância com essas observações relatou-se, ainda, que a hiperexpressão de $RAR\beta$ em células HeLa resultou em dramática supressão da proliferação celular na presença de ácido retinóico *todo-trans*, mas não em sua ausência (FRANGIONI *et al.*, 1994).

Assim, a ativação transcricional mediada pelos receptores nucleares e induzida pelos retinóides pode contribuir para com a atividade anticarcinogênica descrita para diversas dessas substâncias naturais e sintéticas.

Um exemplo já bem conhecido é a ativação do receptor $RAR\alpha$ pela administração de ácido retinóico *todo-trans* ou 9-*cis* como terapia de diferenciação na leucemia promielocítica aguda, com consequente maturação dos promielócitos leucêmicos não-diferenciados e proliferantes, em granulócitos diferenciados não-proliferantes que são, então, eliminados por apoptose (WARRELL *et al.*, 1993; CHOMIENNE *et al.*, 1996).

Descreveu-se ainda que o receptor $RAR\beta$ ativado por seus respectivos ligantes pode ser necessário à atividade anticarcinogênica de análogos da vitamina A em pacientes portadores de

lesões orais (LOTAN *et al.*, 1995), ou em células de câncer de mama, talvez também mediada, neste caso específico, por uma indução de apoptose (LIU *et al.*, 1996).

Por outro lado, a atividade anticarcinogênica dos retinóides pode estar também relacionada à capacidade que alguns destes compostos têm de transreprimir o complexo protéico AP-1, cuja desregulação está associada a estados inflamatórios e à transformação maligna.

Sugeriu-se portanto recentemente que retinóides que têm a capacidade de transreprimir especificamente AP-1, inibindo desta forma os processos de proliferação e transformação das células, poderiam representar valiosos agentes terapêuticos antiproliferativos e contra o câncer, produzindo, inclusive, menos efeitos colaterais (FISHER e VOORHEES, 1996; AGADIR *et al.*, 1997).

Nesse sentido, descreveu-se também nos últimos anos que retinóides com atividade específica anti-AP-1 foram capazes de inibir a proliferação de linhagens de células epiteliais da epiderme de camundongo sensíveis à transformação por agente promotor, e de cânceres de pulmão e de mama (FANJUL *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1996).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar e comparar os efeitos das administrações de β -caroteno e vitamina A em ratos Wistar na etapa de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente".

3.2 Específicos

- Avaliar em ratos Wistar a ocorrência ou não de eventuais efeitos inibitórios do β -caroteno e da vitamina A em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, quando administrados durante a etapa de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente".
- Avaliar em ratos Wistar a ocorrência ou não de eventuais efeitos modulatórios do β -caroteno ou da vitamina A na proliferação celular, quando administrados durante a etapa de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente".
- Avaliar em ratos Wistar a ocorrência ou não de eventuais efeitos modulatórios do β -caroteno ou da vitamina A na metilação dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, bem como do gene que codifica para a enzima HMGCoA redutase, quando administrados durante a etapa de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente".

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados neste estudo ratos machos da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus*, var. albinos, *Rodentia mammalia*), com peso médio inicial de $50,1 \pm 1,9$ g, e obtidos a partir de colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Estes foram mantidos durante todo o experimento em sala desse mesmo biotério provida de ar condicionado, e que propiciava a manutenção de uma temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, bem como de sistema de iluminação programado para geração de ciclos claro-escuro de 12 horas cada, com luz acesa a partir das 6 horas.

Nesse ambiente controlado, os animais foram alojados em número de no máximo quatro, em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável e contendo maravalha previamente esterilizada, que foi trocada rotineiramente em dias alternados. Estes receberam, *ad libitum*, e durante todo o estudo, água e ração comercial peletizada (Purina Nutrimentos Ltda., Campinas, Brasil), sendo ainda controlado o peso dos ratos em dias alternados.

4.2 Delineamento experimental

Após um período de aclimação de 4 dias, com exceção de quatro animais que constituíram um grupo controle não submetido a qualquer procedimento experimental durante todo o estudo (ratos normais), mas que simplesmente permaneceram na mesma dependência do biotério em que os outros grupos experimentais foram alojados até serem sacrificados após 12 meses, todos os outros ratos ($n=28$) foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente" (RH) desenvolvido por SOLT e FARBER (1976), modificado por SEMPLE-ROBERTS *et al.* (1987) e adaptado para ratos Wistar (MORENO *et al.*, 1991).

Para tanto, administrou-se nos animais, logo de início, e por via intraperitoneal, uma única dose (20 mg/100 g de peso corpóreo) necrogênica de dietilnitrosamina (DEN – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), dissolvida em solução salina estéril a 0,9%. Decorridas duas semanas, deu-se início ao processo de seleção/promoção com a aplicação intragástrica, em dose única diária (2 mg/100 g de peso corpóreo), por quatro dias consecutivos, de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF – Sigma) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma) e óleo de milho (Mazola®).

A seguir, 24 horas após a quarta dose de 2-AAF, todos os ratos foram submetidos a uma hepatectomia parcial a 70%, basicamente de acordo com HIGGINS e ANDERSON (1931), e no 2º e 4º dias após a cirurgia, administrou-se ainda nos mesmos, por via intragástrica, doses únicas de 2-AAF (20 mg/kg de peso corpóreo), também dissolvidas em dimetilsulfóxido e óleo de milho (Figura 1).

Após esse procedimento, os animais foram distribuídos, quando indicado, em três diferentes grupos experimentais, ou seja, nos grupos denominados **OM**, **β C** e **VA**, respectivamente.

Decorridos 10 meses da iniciação com DEN, deu-se início ao tratamento dos três grupos de ratos, com óleo de milho (grupo **OM**; 0,25 mL/100 g de peso corpóreo), β -caroteno (grupo **β C**; 7 mg/100 g de peso corpóreo dissolvidos em 0,25 mL de óleo de milho; *trans* β -caroteno tipo 1, Sigma) ou vitamina A (grupo **VA**; 1 mg/100 g de peso corpóreo dissolvido em 0,25 mL de óleo de milho; acetato de retinila, Merck, RJ, Brasil), respectivamente, por via intragástrica e em dias alternados, e que se estendeu por 8 semanas consecutivas até a ocasião do sacrifício dos animais (Figura 1).

FIGURA 1. Representação esquemática do modelo experimental.

DEN - Dietilnitrosamina (20 mg/100 g de peso corpóreo)

2-AAF - 2-Acetilaminofluoreno (6 x 2 mg/100 g de peso corpóreo)

HP - Hepatectomia parcial (70%)

OM - Óleo de milho (0,25 mL/100 g de peso corpóreo)

BC - β -Caroteno (7 mg/100 g de peso corpóreo)

VA - Vitamina A (1 mg/ 100 g de peso corpóreo)

S - Sacrifício

4.3 Verificação da Pureza do β -caroteno e da Vitamina A a Serem Administrados nos Animais

Para cálculo das quantidades adequadas de β -caroteno e vitamina A a serem administradas nos animais em dias alternados e por 8 semanas consecutivas, verificou-se a pureza dessas substâncias após preparo de uma solução-mãe de concentração teoricamente conhecida, do carotenóide (*trans* β -caroteno tipo 1, Sigma) em éter de petróleo (Synth PA) e da vitamina A (acetato de retinila, Merck) em hexano (Merck PA). Devido à alta concentração dessas soluções, estas foram a seguir diluídas, procurando-se obter as concentrações adequadas para leituras a serem realizadas em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU-70, CA, EUA).

De posse dos valores de absorbâncias máximas, calculou-se o teor real de β -caroteno e retinol (vitamina A) nas respectivas soluções, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\mu\text{g do composto}}{\text{mL de solução}} = \frac{A_{\text{máx}} \times \text{vol.} \times 10^4}{1\% E_{1\text{ cm}}}$$

onde: $A_{\text{máx}}$ = absorbância máxima
 $1\% E_{1\text{ cm}}$ = coeficiente de absorção, específico para cada composto em um determinado solvente
vol. = volume (mL) do solvente em que o composto foi dissolvido.

O valor do coeficiente de absorção utilizado para o cálculo do β -caroteno foi de 2592, referente ao éter de petróleo (DAVIES, 1976), realizando-se a varredura entre 350 e 520 nm no espectrofotômetro.

Da mesma forma, o valor do coeficiente de absorção empregado para o cálculo do retinol foi de 1826, referente ao hexano (RETTENMAIER e SCHUEP, 1992), sendo a varredura realizada entre 300 e 350 nm.

Determinou-se a porcentagem de pureza relacionando-se os valores real e teórico.

4.4 Sacrifício dos Animais

Decorridas as 8 semanas de tratamento dos três grupos experimentais, na noite anterior ao sacrifício retirou-se as rações que estavam à disposição dos ratos.

Uma hora antes deste ocorrer administrou-se, entretanto, em todos os animais, uma única dose intraperitoneal (10 mg/100 de peso corpóreo) de 5-bromo,2-desoxiuridina (BrDU – Sigma), dissolvida em DMSO (Sigma) e solução salina (1:3 v/v).

Além disso, antes do sacrifício pesou-se todos os ratos em balança eletrônica digital (ACATEC BCM 1100; São Paulo, Brasil). A seguir, estes foram anestesiados com éter etílico (Merck PA) e colocados em decúbito dorsal sobre prancha cirúrgica, procedendo-se, então, à laparotomia.

O sacrifício se deu sob inalação contínua do anestésico, através de secção da aorta abdominal e consequente choque hipovolêmico.

Em seguida, retirou-se o fígado dos ratos, que foi então "lavado" em solução salina à 0,9% gelada, pesado em balança eletrônica digital ACATEC BCM 1100 e examinado do ponto de vista macroscópico.

Subsequentemente, seccionou-se cada lobo hepático em fatias de aproximadamente 0,3 cm de espessura compreendendo, concomitantemente, regiões ao redor das lesões consideradas "normais" à macroscopia e as próprias lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, para posterior fixação e realização de exames microscópicos (histoquímica enzimática para a γ GT, histopatológico através da hematoxilina-eosina e imunohistoquímica para a BrDU).

Colheu-se na ocasião amostras do lobo direito do fígado contendo apenas as regiões consideradas "normais" à macroscopia para determinação das concentrações hepáticas de β -caroteno, retinol e DNA, bem como para a avaliação da metilação dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc* e do gene que codifica para a enzima HMGC_oA redutase. Da mesma forma, colheu-se também amostras de lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas eventualmente presentes, especificamente para avaliação da metilação dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, bem como do gene para a enzima HMGC_oA redutase. Estas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, a seguir, armazenadas em congelador a -70°C (Kelvinator series 100, Wis., EUA).

4.5 Exame Macroscópico

Cada lobo do fígado foi examinado individualmente, logo de início, quanto à presença em sua superfície de formações pré-neoplásicas (**Figuras 2a, b e c**) ou neoplásicas (**Figuras 3a e b**) de tamanhos variados e coloração em geral esbranquiçada ou amarelada, que se distinguiam do parênquima hepático.

Após o exame da superfície, cada lobo hepático foi seccionado em fatias de aproximadamente 0,3 cm de espessura, sendo, então, também identificadas e contadas as lesões internas.

FIGURA 2. Aspecto macroscópico de fígado de rato tratado com óleo de milho (a), β -caroteno (b) ou vitamina A (c) por oito semanas consecutivas durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente". Observar a presença de formações nodulares (seta) na superfície, de cor amarelada e com contornos bem definidos.

a

b

c

4

Figura 3 a e b. Aspecto macroscópico de fígado de rato tratado com óleo de milho por oito semanas consecutivas durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”. Observar na superfície dos diversos lobos hepáticos, a presença de formações nodulares de coloração amarelada ou esbranquiçada, com volumes desiguais e contornos irregulares e mal delimitados, comprometendo e deformando grosseiramente o órgão.

a

b

4.6 Exame Microscópico

4.6.1 Microscopia de Luz

Por ocasião do sacrifício dos animais foram colhidos fragmentos representativos de cada lobo hepático, de aproximadamente 5 mm de espessura, e submetidos aos seguintes procedimentos:

4.6.1.1 Histoquímica Enzimática para Evidenciação da Atividade de γ -glutamyltranspeptidase (γ GT)

Os fragmentos de fígado foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e transportados em gelo seco, para subsequente estocagem em congelador a -70°C .

Posteriormente, utilizou-se um criostato Cryocut 1800 (Reichert-Jung; Alemanha), do Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, para obtenção de cortes de 10 micrômetros. A seguir, estes foram fixados em acetona (Synth PA) a 4°C por 10 minutos e mantidos em geladeira até a realização da reação de coloração.

Nesse sentido, a técnica utilizada foi a preconizada por RUTENBURG *et al.* (1969). Para tanto, realizou-se, inicialmente, incubação dos cortes em estufa a 37°C , por 30 minutos, com a seguinte mistura:

- 2,5 mg de γ -glutamyl-4-metoxi-2-naftilamida (Sigma), dissolvidos em 0,05 mL de DMSO (Sigma);
- 0,05 mL de hidróxido de sódio 1 N (Merck PA);
- 14 mL de cloreto de sódio a 0,85% (J. T. Backer PA, SP, Brasil);
- 10 mL de glicil-glicina (Sigma), e
- 10 mg de *Fast Blue BB salt* (Sigma).

A seguir, após a incubação, lavou-se os cortes por 2 minutos em solução salina à 0,9%, em solução de sulfato de cobre 0,1 M (J. T. Backer PA) por 2 minutos e, novamente, em solução salina a 0,9% por 2 minutos.

Efetuada a coloração, montou-se os cortes em glicerina para subsequente exame quantitativo em sistema computadorizado de análise de imagem, constituído por um microscópio (Olympus, Japão) ou lupa ao qual se encontrava acoplada câmera de vídeo que se conectava a um microcomputador AT-486, equipado com placa apropriada e com o programa BIOSCAN-OPTIMAS 4.1 (Edmonds, CA, EUA).

Para tanto, após calibração do equipamento, delimitou-se as áreas de interesse com o cursor, fornecendo o programa automaticamente suas respectivas dimensões em cm^2 .

4.6.1.2 Exame Histopatológico Através de Coloração pela Hematoxilina e Eosina

Fragmentos representativos de cada lobo hepático foram também fixados em formol a 10%, em solução salina tamponada com fosfato (PBS), durante aproximadamente 48 horas.

A seguir, estes materiais foram processados por técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina, obtendo-se, posteriormente, cortes seriados de aproximadamente 5 μ m. Estes foram, subsequentemente, corados com hematoxilina de HARRIS e eosina, basicamente como descrito por JUNQUEIRA e JUNQUEIRA (1983).

4.6.1.3 Exame Imunohistoquímico para a BrDU

Fragmentos representativos de cada lobo hepático contendo áreas consideradas "normais" à macroscopia e lesões pré-neoplásicas, bem como, eventualmente, neoplásicas, foram fixados em metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial; Merck PA) por aproximadamente 48 horas.

Em seguida, estes foram submetidos às técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina, sendo, então, obtidos cortes seriados de aproximadamente 5 μ m.

Subsequentemente, realizou-se nos mesmos a técnica imunohistoquímica para a BrDU, utilizando-se, para tanto, anticorpos primários monoclonais anti-BrDU (Dako, Dinamarca) na diluição de 1:60 e anticorpos secundários biotinizados anti-imunoglobulinas de coelho (Vector Laboratories, CA, EUA), na diluição de 1:400.

O método utilizado foi basicamente o da avidina-biotina (HSU *et al.*, 1981), intercalando-se cada procedimento com lavagens das lâminas em solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Assim, nesse sentido, logo de início os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em sequência dos álcoois absoluto, a 95% e a 70%, e, por último, em água destilada.

A seguir, estes foram incubados por 1 hora em ácido clorídrico 2N (Merck, PA), bloqueando-se, subsequentemente, por 30 minutos, a peroxidase endógena através de incubação das lâminas em metanol (Labsynth, PA) contendo 50% de peróxido de hidrogênio a 30 volumes (Labsynth, PA).

Estes cortes foram, então, incubados com os anticorpos primários na diluição já mencionada, por período de uma noite, a 4°C e em câmara úmida. Para diluição desses anticorpos utilizou-se uma solução contendo soro-albumina a 5% (albumina bovina fração V-Sigma) em água destilada (1,25 mL), azida sódica a 5% (Labsynth PA) em água destilada (2,5 mL) e solução salina tamponada (PBS; 59 mL).

Em seguida, incubou-se os cortes por 30 minutos com os anticorpos secundários biotinizados na diluição anteriormente citada, seguindo-se a aplicação do conjugado avidina-biotina-peroxidase (Vectastain-ABC kit, Vector) diluído em PBS (1:400), por 30 minutos, e, posteriormente, de solução contendo substrato da peroxidase preparada imediatamente antes da utilização e consistindo na mistura de peróxido de hidrogênio a 0,02% (Merck PA) com 3,3'-diaminobenzidina (Sigma) a 0,1% em PBS.

Finalmente, estes foram lavados em PBS por 5 minutos, contracorados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética.

4.6.1.3.1 Quantificação dos Hepatócitos Marcados com BrDU

Para a quantificação dos hepatócitos marcados com a BrDU (**Figura 4**), foram contados 1000 núcleos de hepatócitos no tecido considerado "normal" ao redor das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, compreendendo aproximadamente 350 núcleos em cada uma das três zonas de RAPPAPORT e 1000 núcleos de hepatócitos nas áreas de lesão. Segundo RAPPAPORT *et al.* (1954), classifica-se como zona I do parênquima hepático as regiões situadas ao redor dos vasos aferentes, como zona II as regiões intermediárias entre as zonas I e III, e como zona III as regiões próximas às veias centrolobulares.

Os resultados foram expressos através do índice de marcação (I.M.), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{I.M.} = \frac{\text{Nº de núcleos positivos para a BrDU} \times 100}{\text{Nº total de núcleos contados}}$$

Figura 4. Núcleos de hepatócitos corados em marrom (seta) apresentando padrão típico de marcação de BrDU. (Estreptavidina-biotina-peroxidase/Hematoxilina, 560x)

4.7 Determinação das Concentrações Hepáticas de β -caroteno e retinol

Para a determinação das concentrações hepáticas de β -caroteno e retinol, colheu-se, durante o sacrifício, amostras com aproximadamente 1 g do lobo direito do fígado dos animais, de áreas consideradas "normais" ao exame macroscópico. Estas foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e transportadas em gelo seco, para subsequente estocagem em congelador a -70°C .

As análises de β -caroteno e retinol no fígado foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para tanto, realizou-se, logo de início, os processos de saponificação e extração do retinol e β -caroteno, basicamente de acordo com AL-ABDULALY e SIMPSON (1989).

Assim, o fígado foi pesado em tubo de ensaio e homogeneizado com triturador tipo Turrax (Marconi, SP, Brasil), utilizando-se aproximadamente 2 mL de água destilada. A seguir, adicionou-se 30 mL de KOH metanólico a 30% (Synth PA) (p/v), deixando-se a mistura em repouso durante uma noite, no escuro, sob nitrogênio e à temperatura ambiente.

Ao término desse período, a mistura foi transferida para um erlenmeyer contendo 50 mL de éter etílico (Synth PA) e agitada mecanicamente por 15 minutos, sendo, então, transferida para um funil de separação, onde se descartou a fase metanólica.

A seguir, removeu-se o álcali residual presente na fase etérea através de sucessivas lavagens com água destilada, transferindo-se, subsequentemente, a solução para um erlenmeyer e retirando-se a água remanescente através da adição de sulfato de sódio anidro (Synth PA).

O éter etílico contendo o β -caroteno e o retinol foi, então, transferido para um balão e evaporado até à secura, em rota-evaporador a vácuo (Tecnal, SP, Brasil).

Em seguida, lavou-se esse balão com 2 mL de éter etílico e separou-se a solução em duas alíquotas de 1 mL cada, evaporando-se subsequentemente o éter com nitrogênio. A uma dessas alíquotas adicionou-se 0,3 a 0,5 mL de metanol (Merck, grau HPLC) para a determinação de β -caroteno, e na outra cerca de 0,5 a 2,0 mL de hexano (Merck, grau HPLC) para análise de retinol.

Antes da injeção no cromatógrafo as amostras foram filtradas em membranas de $0,45\ \mu\text{m}$ de malha.

O β -caroteno presente no fígado foi determinado através de cromatografia de fase reversa, basicamente de acordo com SCHMITZ *et al.* (1991).

Para tanto utilizou-se cromatógrafo Shimadzu LC9A (Japão) com sistema de bombeamento para multissolventes, auto-injetor e detector UV-VIS. Alíquotas com volume correspondente a $20\ \mu\text{L}$ foram injetadas no aparelho, sendo o carotenóide separado em coluna C18 (Vydac 201 TP 54; $5\ \mu\text{m}$, $250 \times 4,6\ \text{mm DI}$) e eluído através de fase móvel consistindo em uma mistura de metanol (Merck grau HPLC), acetonitrila (Merck grau HPLC) e água (88:9:3 v/v/v), com fluxo de 2 mL/minuto. A detecção foi realizada no comprimento de onda de 452 nm.

Por outro lado, a determinação do retinol no fígado foi realizada através de cromatografia líquida em fase normal, basicamente de acordo com RETTENMAIER e SCHUEP (1992), e empregando o mesmo cromatógrafo e sistema de bombeamento e injeção descritos acima, com exceção do detector, que no caso foi de fluorescência.

Além disso, para a separação do retinol nas alíquotas de $20\ \mu\text{L}$ que foram injetadas no aparelho, utilizou-se coluna de sílica com micro-esferas de $5\ \mu\text{m}$, 6 mm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento (Shimadzu, Japão), bem como sistema de eluição isocrático (fluxo de

2,0 mL/minuto) com fase móvel consistindo de uma mistura de hexano (Merck grau HPLC) com isopropanol (Merck grau HPLC), na proporção de 99:1 (v/v). Para a detecção, os comprimentos de onda empregados foram: emissão = 480 nm e excitação = 330 nm.

De acordo com essas condições experimentais, o tempo de retenção do β -caroteno foi de aproximadamente 12 minutos e o da vitamina A de 8 minutos, tendo sido estes identificados através de comparação com os tempos de retenção dos picos dos padrões correspondentes, ou seja, do β -caroteno *todo-trans* (Sigma) e do retinol *todo-trans* (Sigma).

Da mesma forma, a quantificação desses compostos foi feita através de determinação das áreas dos picos e comparação com os respectivos padrões, utilizando-se curvas de calibração. Antes da construção das mesmas verificou-se o grau de pureza dos padrões, conforme descrito no item 3.3.

4.8 Determinação da Concentração Hepática de DNA

Para a determinação da concentração hepática de DNA foi utilizado o método bioquímico de BURTON (1956), realizando-se as análises em duplicatas e com repetições, em amostras contendo aproximadamente 1 g de fígado obtidas de regiões do lobo direito consideradas "normais" ao exame macroscópico, e armazenadas a -70°C .

Assim, após pesagem de 500 mg de fígado em balança eletrônica digital estes foram triturados em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem com 3 mL de ácido perclórico (PCA; Merck PA) 1 N gelado, centrifugando-se o homogeneizado, subsequentemente, a 8000 r.p.m. (centrífuga Sorvall Instruments, EUA, modelo RC5C, rotor SS34) por 10 minutos, à temperatura de 4°C .

Desprezou-se, em seguida, o sobrenadante.

A seguir, com auxílio de bastão de vidro, dissolveu-se o precipitado em 6 mL de PCA 0,5 N gelado, agitou-se o mesmo por 2 minutos em agitador de tubos (Marconi, modelo 162, SP, Brasil) e centrifugou-se a suspensão a 8000 r.p.m., por 10 minutos e à temperatura de 4°C .

Este procedimento foi repetido por mais duas vezes.

A seguir, ressuspendeu-se o precipitado em 4 mL de PCA 0,5 N gelado com ajuda de bastão de vidro, colocando-se, então, a suspensão em banho-maria (New Brunswick Scientific, modelo R76, NJ, EUA) a 70°C , por 1 hora.

Decorrido esse período, e durante o qual se tomou a cautela de agitar manualmente a suspensão a cada 5 minutos, esta foi centrifugada a 8000 r.p.m. por 10 minutos à temperatura de 4°C , armazenado-se, em seguida, o sobrenadante a 4°C .

Para a determinação da concentração de DNA nesse sobrenadante pipetou-se, então, 100 μL dessa amostra em tubo de vidro, adicionando-se 900 μL de PCA 0,5 N e 2 mL de uma solução de difenilamina/acetaldéido, armazenando-se subsequentemente a solução por 17 horas ao abrigo da luz.

A solução de difenilamina/acetaldéido consistiu no seguinte: 50 mL de solução de difenilamina [750 mg de difenilamina (Sigma), 50 mL de ácido acético glacial (Merck PA) e 750 μL de ácido sulfúrico concentrado (Merck PA), juntamente com 250 μL da solução de acetaldéido (125 μL de acetaldéido — Fluka Chemie AG, Suíça — em 6 mL de água destilada)].

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Hitachi modelo U3410 (Japão), no comprimento de onda de 600 nm, determinando-se a concentração de DNA através de comparação com curva padrão construída através da utilização de DNA de timo de vitela (Sigma).

4.9 Análise do Padrão de Metilação dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, bem como do Gene que Codifica para a Enzima HMGC_oA Redutase

4.9.1 Isolamento do DNA Genômico

A avaliação do padrão de metilação dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, bem como do gene que codifica para a enzima HMGC_oA redutase, foi realizada em amostras de fígado de ratos normais, bem como de regiões de tecido hepático do lobo direito consideradas "normais" à macroscopia e de lesões pré-neoplásicas/neoplásicas de ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A da 40^a à 48^a semana do estudo, colhidas durante o sacrifício e armazenadas a -70°C.

Para tanto, procedeu-se, logo de início, ao isolamento do DNA genômico das mesmas mediante centrifugação diferencial (centrífuga Sorvall RC5C, rotor SS34), e basicamente de acordo com o descrito por RAJALAKSHMI *et al.* (1978).

Assim, 0,5-1,0 g de tecido de cada amostra foi homogeneizado, inicialmente, em um triturador Potter-Elvehjem na presença de solução de NaCl (Sigma) 0,075 M, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; Sigma) 0,025 M e Triton X-100 (Sigma) 0,1% e, logo após, centrifugado a 3500 r.p.m., por 10 minutos e a 4°C.

A seguir, o precipitado foi ressuspensionado em solução de cloridrato de trishidroximetilaminometano (Tris-HCl; Sigma) 0,05 M (pH 7,6) contendo 0,1% de Triton e centrifugado a 3500 r.p.m., por 10 minutos e a 4°C.

Repetiu-se esse procedimento por duas vezes, seguindo-se duas outras "lavagens" do precipitado com solução de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6.

Em seguida, ressuspendeu-se, novamente, o precipitado de núcleos em solução de Tris-HCl 0,05 M (pH 7,6) contendo 0,1% de Triton X-100 e centrifugou-se a 3500 r.p.m. por 10 minutos a 4°C. Tais "lavagens" foram efetuadas por duas vezes, seguindo-se duas outras "lavagens" com solução de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6.

O precipitado resultante foi ressuspensionado, agora, em solução de Tris-HCl 0,01 M (pH 8,0), e centrifugado a 3500 r.p.m. por 10 minutos, a 4°C.

A cromatina solubilizada nessa solução de Tris-HCl 0,01M (pH 8,0), foi então desproteínizada, após adição de NaCl a uma concentração final de 1 M, com 100 μ g/mL de proteinase K (Sigma), pelo período de uma noite, a 37°C e sob agitação contínua.

A seguir, adicionou-se à essa cromatina digerida um volume igual de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (Sigma) (24:1, v/v), agitando-se a mesma delicadamente por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após centrifugação a 5000 r.p.m. por 20 minutos, recolheu-se a fase aquosa cuidadosamente, procurando-se evitar contaminação com a camada de proteínas desnaturadas, estratificada na interface com a fase orgânica.

Em seguida, após adição de dois volumes de álcool etílico absoluto (Merck PA) gelado, realizou-se precipitação do DNA por período de uma noite, à temperatura de -20°C.

O precipitado foi ressuspensionado em solução de NaCl a 0,01 M e Tris-HCl 0,01 M (pH 8,0), eliminando-se, subsequentemente, o RNA contaminante através do tratamento com 100 μ g/mL de RNase livre de DNase (RNase A, Pharmacia Biotech, EUA), por 2 horas e à temperatura de 37°C.

A seguir, realizou-se nova extração com solução de clorofórmio:álcool isoamílico e precipitação em etanol absoluto, como descrito anteriormente. O DNA purificado foi, então, "lavado" em etanol a 70%, secado à temperatura ambiente e dissolvido em solução de Tris-HCl 0,01 M (pH 8,0). Posteriormente, sua concentração foi determinada em um comprimento de onda de 260 nm, utilizando-se, para tanto, espectrofotômetro Hitachi modelo U3410 (Japão).

4.9.2 Digestão do DNA Genômico com Enzimas de Restrição

Para avaliação do padrão de metilação dos oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, bem como do gene que codifica para a enzima HMGC_oA redutase, o DNA genômico (10 μ g) extraído das amostras de fígado foi, então, submetido à digestão com 5 U/ μ g de DNA das enzimas de restrição *Hpa* II e *Msp* I (Pharmacia), por 3 horas e à 37°C.

Após a digestão, e previamente à eletroforese das amostras de DNA digerido em gel de agarose a 1% (Sigma), adicionou-se às mesmas 3 μ L de solução contendo glicerol a 30% em água grau reagente tipo I (Milli-Q Plus, Millipore Co., EUA), EDTA (Sigma) a 1 mM, azul de bromofenol (Sigma) a 0,25% e xileno cianol FF (Sigma) a 0,25%.

4.9.3 Eletroforese em Gel de Agarose e Transferência para Suporte Sólido

Os fragmentos de restrição resultantes da digestão do DNA genômico (10 μ g) com as enzimas *Hpa* II e *Msp* I, bem como amostra de DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição *Hind* III (Sigma) e utilizado como marcador, foram então separados através de eletroforese horizontal em gel de agarose (Sigma) a 1%, durante 16 horas, a 20 V e em tampão TPE 1x contendo Tris-HCl 0,036 M, NaH₂PO₄ (Sigma) 0,03 M e Na₂EDTA (Sigma) 0,01 M, pH 7,5. Subsequentemente, fotografou-se (Polaroid, modelo DS 34; England) o gel em transiluminador equipado com luz UV (Pharmacia) e utilizando-se filme Polaroid 667, após coloração do mesmo com brometo de etídio (0,5 μ g/mL; Sigma).

A seguir, transferiu-se o DNA para membrana de nitrocelulose com suporte (Schleicher & Schuell 0,45 μ m), basicamente de acordo com método descrito originalmente por SOUTHERN (1975).

Para tanto despurinizou-se previamente o DNA, imergindo-se o gel por 15 minutos em HCl (Merck PA) 0,2 M. Além disso, após lavagem do gel com água grau reagente tipo I desnaturou-se o DNA em solução contendo NaOH (Merck PA) 0,5 M e NaCl 1,5 M, por 15 minutos. Este procedimento foi repetido, com subsequente neutralização em tampão contendo Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 e NaCl 1,5 M, por 30 minutos. Cada uma dessas etapas foi realizada com suave agitação do gel mergulhado nas respectivas soluções, e à temperatura ambiente.

A transferência foi efetuada por capilaridade durante período compreendendo cerca de 18-20 horas, através da utilização de papel de filtro 3 MM Chr. (Whatman International Ltd., England) e tampão SSC 20x pH 7,0 (NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M).

Em seguida, fixou-se irreversivelmente o DNA à membrana de nitrocelulose, expondo-se a mesma por 2 horas a uma temperatura de 80°C, em forno à vácuo (25 mm Hg; Fanem modelo 099, Brasil).

4.9.4 Pré-hibridização, Hibridização, Lavagem da Membrana e Autorradiografia

Tais procedimentos foram realizados, basicamente, de acordo com o descrito por SAMBROOK *et al.* (1989).

Assim, a membrana de nitrocelulose contendo o DNA genômico digerido foi pré-hibridizada, logo de início, em forno de hibridização (Techne modelo HB200; Techne

(Cambridge) Ltd., England), por uma noite e a 42°C, em um excesso de solução (0,1 mL/cm² de membrana) contendo: formamida desionizada a 50% (Sigma), SSC 6x, solução de Denhardt 5x (0,5 g Ficoll 400 [Pharmacia], polivinilpirrolidona [Sigma], albumina bovina fração V), dodecilsulfato de sódio (SDS; Sigma) a 0,5%, NaH₂PO₄ 0,05M pH 7,0 e 100 µg/mL de DNA sonificado de esperma de salmão (Pharmacia) desnaturado mediante fervura por 10 minutos e rápido resfriamento em gelo por 2 minutos.

Subsequentemente, por ocasião da etapa de hibridização, conduzida a 42°C e por 48 horas, adicionou-se à solução de pré-hibridização a sonda marcada com ³²P, após desnaturação da mesma através de fervura por 10 minutos e incubação em gelo por 2 minutos.

Decorrido o procedimento, descartou-se a solução de hibridização e lavou-se gentilmente a membrana sob agitação, por período de 5 minutos e à temperatura ambiente, em uma solução contendo SSC 2x e SDS a 0,5%, e, em seguida, por 15 minutos à temperatura ambiente em uma solução SSC 2x e SDS 0,1% e, finalmente, por 10 minutos a 52°C em uma solução SSC 0,1x e SDS 0,5%.

Após as lavagens, e enquanto ainda úmida, envolveu-se a membrana em filme de PVC, retirando-se o excesso de líquido através de suave compressão manual sobre a mesma. Em sala escura apropriada, esta foi então colocada entre filmes radiográficos X-OMAT-K (Eastman Kodak Co., NY, EUA), inserindo-se, em seguida, todo o conjunto em um chassi de metal contendo telas intensificadoras (Imagem Lanex, base verde; Eletro Médica, Brasil), que foi posteriormente armazenado a -70°C.

Decorrido o tempo adequado de exposição (de um dia a uma semana), revelou-se e fixou-se os filmes radiográficos utilizando-se, para tanto, revelador e fixador GBX (Kodak Brasileira Com. Ind. Ltda; Brasil), respectivamente, de acordo com as instruções do fornecedor.

4.9.5 Origem das Sondas e suas Marcações

As sondas *v-Ha-ras*, de rato, com 0,73 kb, e *c-myc* humana, com 1,4 kb e para o 3º éxon, foram adquiridas da Oncor[®], Gaithersburg, MD, EUA.

Por outro lado, a sonda para o gene da HMGCoA redutase foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. D.S.R. Sarma, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Toronto, Canadá, e consistia em um fragmento com 4,5 kb do plasmídeo pRed227 (ATCC), representando o cDNA para a HMGCoA redutase de hamster e contendo toda a região codificante, bem como 163 pb da região 5' não-traduzível e 1,65 kb da sequência 3' não-traduzível (CHIN *et al.*, 1984).

Estas foram marcadas com α -³²P-dCTP (Amersham, sp. act. 6000 Ci/mmol) utilizando-se o conjunto Multiprime DNA Labelling System da Amersham, de acordo com as instruções do fornecedor e essencialmente conforme os procedimentos descritos por FEINBERG e VOGELSTEIN (1983b, 1984).

Após a marcação por período de uma noite, as sondas foram purificadas dos nucleotídeos marcados não-incorporados, mediante filtração em gel de Sephadex G-50, utilizando-se, para tanto, colunas descartáveis (Nick[®] Column; Pharmacia). Foram obtidas, rotineiramente, sondas com atividades específicas correspondendo a (1-3) x 10⁹ cpm/µg de DNA.

4.10 Análise Estatística

Quando indicado, a análise estatística dos resultados foi realizada com auxílio do programa INSTAT para microcomputador (GraphPad Software V2.01 - Copyright 1990-1993).

Assim, logo de início, para se verificar a existência de diferenças significantes entre os diversos grupos experimentais utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, análise de variância não-paramétrica capaz de verificar heterogeneidade entre grupos em que o $n < 30$. Quando isto ocorreu, empregou-se, logo a seguir, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney com nível de confiança de 95%, para a realização de comparações grupo a grupo (GAD e WEIL, 1989).

5. RESULTADOS

5.1 Curva Ponderal dos Animais Durante Aplicação do Modelo de Hepatocarcinogênese

A **Figura 5** demonstra curva que ilustra o comportamento durante os primeiros sessenta dias do estudo, dos pesos corpóreos dos ratos Wistar que foram submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente" (RH). Pode-se observar nessa **Figura** que durante esse período os animais tenderam, de uma forma geral, a ganhar peso, exceto durante quatro dias após a aplicação intraperitoneal do carcinogênico iniciante dietilnitrosamina (DEN) e durante a fase de administração das 6 doses de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) por intubação gástrica, quando este se manteve praticamente constante, bem como após a realização da hepatectomia parcial a 70%, quando houve, inclusive, e como esperado, decréscimo ponderal.

Estas variações devem refletir, portanto, além do crescimento normal esperável em ratos jovens, os momentos em que estes sofreram as respectivas intervenções relativas à aplicação do modelo de hepatocarcinogênese e as próprias toxicidades da DEN e do 2-AAF, nas concentrações em que foram empregados.

Decorridos esses sessenta dias, os animais foram distribuídos em três grupos experimentais a serem tratados a partir da 40ª semana da aplicação da DEN, com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**), respectivamente (**Figura 1**).

FIGURA 5. Curva de peso dos ratos Wistar durante a aplicação do modelo do "hepatócito resistente".

5.2 Pesos Corpóreos ao Início e Final do Tratamento, Bem como Pesos dos Fígados por Ocasão do Sacrifício

Assim, após 40 semanas da realização do processo de iniciação com DEN deu-se início ao tratamento dos animais dos grupos experimentais **OM** (controles), **β C** e **VA**, com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A, respectivamente, e que se estendeu por oito semanas consecutivas, quando, então, os ratos foram sacrificados durante a fase de progressão do modelo do "hepatócito resistente".

Desta forma, a **Tabela 1** demonstra os pesos corpóreos dos animais quando do início do tratamento e do sacrifício, bem como os pesos de seus fígados nessa ocasião.

Tabela 1. Pesos corpóreos e dos fígados de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA), por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Grupos	N	Peso corpóreo inicial* (g)	Peso corpóreo final* (g)	Peso do fígado* (g)	Peso relativo do fígado/100 g de peso corpóreo*
OM	8	496,6 $\pm$ 37,9	501,0 $\pm$ 41,2	23,4 $\pm$ 7,5	4,7 $\pm$ 1,7
β C	8	491,0 $\pm$ 55,0	507,0 $\pm$ 36,9	18,5 $\pm$ 4,7	3,6 $\pm$ 0,9
VA	8	494,0 $\pm$ 56,1	499,4 $\pm$ 47,6	19,7 $\pm$ 8,4	4,0 $\pm$ 1,7

n = número de animais

* = os valores representam, respectivamente, média $\pm$ desvio padrão da média.

Pode-se observar nessa **Tabela**, a homogeneidade dos pesos corpóreos dos animais dos três grupos experimentais, por ocasião do início das administrações de óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (**VA**) na 40ª semana após aplicação do carcinogênico iniciante DEN.

Aos 12 meses de experimento, ou seja, após 8 semanas consecutivas de tratamento e quando do sacrifício dos animais na fase de progressão do modelo do RH, observa-se ainda na **Tabela 1** que os pesos corpóreos dos ratos dos três grupos experimentais praticamente não diferiram entre si, e que os pesos dos animais dos grupos **VA** e **OM** se mantiveram praticamente inalterados em relação a seus respectivos pesos apresentados por ocasião do início das aplicações na 40ª semana, enquanto houve certa tendência, embora não estatisticamente significativa de acordo com o teste de Mann Whitney para amostras não-pareadas, destes aumentarem no grupo β C. Isto pode indicar que as doses administradas do carotenóide, e até mesmo do retinóide, não resultaram no presente estudo em toxicidade geral digna de nota.

Por outro lado, embora também não resultando em diferenças significantes do ponto de vista estatístico de acordo com o teste de Mann Whitney para amostras não-pareadas, os pesos dos fígados, inclusive dos relativos, dos animais tratados com β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo **VA**) durante 8 semanas consecutivas e sacrificados 12 meses após aplicação

da DEN, tenderam a ser menores do que os dos ratos que receberam tão somente óleo de milho durante esse mesmo período (grupo **OM** — controles) (Tabela 1). Estas observações sugerem que as doses administradas do carotenóide, ou da vitamina A, não resultaram, da mesma forma, em hepatotoxicidade digna de nota nessas condições experimentais, podendo ainda refletir, inclusive, a presença de lesões neoplásicas malignas constatada em maior número no grupo **OM** (controles) (Tabela 2).

5.3 Quantificação das Lesões Nodulares e de Cânceres Observados Macroscopicamente

A Tabela 2 apresenta a observação macroscópica de fígados de ratos Wistar submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente", tratados a partir da 40ª semana do experimento com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**) durante 8 semanas consecutivas, e sacrificados, portanto, ao término da 48ª semana do estudo, em fase adequada à constatação da presença de neoplasias malignas.

Nessa etapa do processo de hepatocarcinogênese desencadeado pelo modelo do RH em ratos Wistar, ou seja, 1 ano após a aplicação do carcinogênico iniciante DEN, espera-se constatar ao exame macroscópico, em maior ou menor número de animais, a presença simultânea nos fígados dos mesmos, de uma quantidade variável de nódulos persistentes de hepatócitos ou cânceres.

Tabela 2. Quantificação das lesões nodulares macroscópicas, bem como de cânceres, de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Grupos	Nº. de ratos com nódulos persistentes	Incidência de nódulos persistentes (%)	Nº. total de nódulos persistentes	Nº. de ratos com câncer	Incidência de cânceres (%)
OM	5/8	62,5	26	5/8	62,5
βC	6/8	75,0	27	2/8	25,0
VA	3/8	37,5	8	2/8	25,0

Pode-se constatar na Tabela 2 que ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com vitamina A (grupo **VA**), apresentaram por ocasião do sacrifício, em comparação a animais do grupo **OM** (controles), menores incidências de nódulos persistentes de hepatócitos e cânceres. Além disso, ainda em comparação ao grupo **OM**, ratos aos quais se administrou esse retinóide natural (grupo **VA**) por 8 semanas consecutivas durante fase do modelo de hepatocarcinogênese propícia ao desenvolvimento de neoplasias malignas, também apresentaram menor número total de nódulos persistentes de hepatócitos.

Por outro lado, quando comparados aos controles (grupo **OM**), ratos tratados com β -caroteno (grupo **β C**) da 40ª à 48ª semana após iniciação com o carcinogênico DEN, apresentaram maior incidência de nódulos persistentes, mas menor incidência de cânceres, ao exame macroscópico por ocasião do sacrifício (**Tabela 2**). Além disso, estes apresentaram (grupo **β C**) praticamente o mesmo número total de nódulos persistentes que animais do grupo controle (**OM**).

5.4 Quantificação dos Focos e Nódulos de Hepatócitos Marcados Positivamente pela Enzima γ -glutamyltranspeptidase (γ GT)

Os resultados das quantificações dos focos e dos nódulos de hepatócitos marcados positivamente pela enzima γ GT apresentados por animais tratados com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**) e sacrificados na fase de progressão do modelo do RH, realizadas em sistema de análise de imagem computadorizado, estão apresentados na **Tabela 3**.

A técnica empregada para marcar a γ GT demonstrou resultados satisfatórios no presente estudo, do ponto de vista morfológico. Além de delimitar áreas de hepatócitos alterados (focos ou nódulos pré-neoplásicos), esta revelou que os ductos biliares também se mostravam positivos para essa enzima, da mesma forma que grupos de células alongadas (células ovais) que entremeavam o parênquima hepático e também delimitavam algumas lesões pré-neoplásicas (focos e nódulos de hepatócitos).

Tabela 3. Quantificação dos focos e nódulos pré-neoplásicos (F/N) positivos para a enzima γ GT, de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**) por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Grupos	n	Número de F/N por cm ^{2*}	Área média de F/N por mm ^{2*}	% de Área do corte ocupada por F/N*
OM	8	5,68 $\pm$ 4,0	0,80 $\pm$ 0,6	4,11 $\pm$ 3,6
βC	8	5,51 $\pm$ 3,7	0,47 $\pm$ 0,2	3,25 $\pm$ 2,2
VA	8	5,71 $\pm$ 2,5	0,48 $\pm$ 0,2	2,78 $\pm$ 2,0

n = número de animais

* = os valores representam, respectivamente, média $\pm$ desvio padrão da média.

Pode-se observar na **Tabela 3** que foi praticamente idêntico o número de lesões pré-neoplásicas (focos e nódulos) marcadas positivamente pela enzima γ GT, observado no fígado dos animais dos grupos **OM** (controles), **β C** e **VA**, ou seja, daqueles submetidos ao modelo do RH e tratados da 40ª à 48ª semana do estudo com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A, respectivamente, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese. Todavia, pode-se também constatar nessa **Tabela** que animais tratados com β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**) por 8 semanas consecutivas, tenderam a apresentar por ocasião do sacrifício ao

término da 48ª semana, lesões pré-neoplásicas (focos e nódulos de hepatócitos) positivas para a enzima γ GT com menores áreas médias e que ocupavam menores porcentagens da área do corte, do que ratos do grupo OM (controles). Estas diferenças não atingiram, entretanto, significância do ponto de vista estatístico, de acordo com o teste de Mann Whitney para amostras não-pareadas.

5.5 Exame Histopatológico dos Fígados dos Ratos Através de Coloração pela Hematoxilina e Eosina

5.5.1 Observação Geral

Focos e nódulos pré-neoplásicos consistem em áreas em que os hepatócitos se encontram morfológicamente alterados, correspondendo, respectivamente, a diâmetros inferior e igual ou superior ao de um lóbulo hepático. Além disso, esses podem ser predominantemente constituídos por células claras, acidófilas, basófilas, ou serem mistos contendo células claras e acidófilas.

O aspecto histológico dos focos e nódulos de hepatócitos dos ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente" (RH) observado no presente estudo confirmou aqueles descritos na literatura.

Assim, nessas áreas os hepatócitos apresentavam alterações morfológicas assumindo arranjo acinar e comprimido, no caso dos nódulos, o parênquima hepático.

As células que compunham os focos predominantemente compostos de células claras (*focos de células claras*) apresentavam-se aumentadas de volume e com seu citoplasma rarefeito. Os núcleos estavam algumas vezes deslocados para um dos polos da célula, mostrando-se pleomórficos e com nucléolos (em número de um, dois ou mais) evidentes. Em geral não se observavam sinusóides no interior desses focos. Além disso, uma população de células alongadas semelhantes às sinusoidais achava-se presente, entremeando os hepatócitos. Com pouca frequência observavam-se células ductulares ("células ovais") envolvendo parcialmente os focos. Desta forma, estes distinguiam-se do parênquima hepático devido às características de suas células, porém não se observava compressão das áreas adjacentes.

Nos focos constituídos predominantemente de células acidófilas (*focos de células acidófilas*), constatavam-se células com volume aumentado e o citoplasma corando-se mais intensamente pela eosina, o que lhes conferia coloração avermelhada uniforme. Corpúsculos semelhantes aos de Councilman, considerados apoptóticos, observados também em hepatites tóxicas ou virais, que apresentam volume reduzido em relação às demais células, intensamente acidófilos e com núcleo picnótico, podiam ser vistos principalmente na região mais periférica dos *focos de células acidófilas*. Nessas células foi possível se observar pleomorfismo nuclear, com a evidência de nucléolos únicos ou múltiplos, que se situavam em uma posição central ou periférica em relação à carioteca. Células binucleadas foram ocasionalmente observadas. Além disso, nesse tipo de foco foram vistas figuras de mitose típicas e atípicas. Entremeando os hepatócitos constou-se a presença de sinusóides e de capilares com a luz dilatada. Uma população de células alongadas semelhantes às que compunham a população sinusoidal, foi também vista em meio aos hepatócitos, dentro dos focos.

Focos mistos, compostos por células claras e acidófilas, foram também observados em todos os grupos de animais submetidos ao modelo do RH. Neste caso, variava a proporção de um e outro tipos celulares. Sinusóides foram vistos entremeando os hepatócitos alterados, principalmente nas lesões com maior área. A delimitação por "células ovais" foi vista com maior frequência, neste caso, do que nos *focos de células claras*.

Foram também observados focos constituídos predominantemente de células basófilas (*focos basófilos*) constituídos por hepatócitos pequenos e que tinham como característica a intensa basofilia citoplasmática. Em geral não se constatou, neste tipo de lesão, anaplasia nem figuras de mitose.

Quanto aos nódulos de hepatócitos, são válidos os mesmos achados e a mesma classificação que para os focos. Entretanto, alguns dos nódulos diferiam quanto à presença de uma delimitação mais evidente feita às custas principalmente de células alongadas do tipo "células ovais", bem como de outras células alongadas e arredondadas que as acompanhavam, além de tecido conjuntivo.

No parênquima hepático livre de focos ou nódulos foram também observadas alterações hepatocelulares, consistindo principalmente de degeneração vacuolar. Além disso, foram constatados infiltrados inflamatórios constituídos predominantemente por células mononucleares, e situando-se em região peri-portal.

Além da presença no fígado dos animais, de focos e nódulos pré-neoplásicos, proliferação de "células ovais" e infiltrado inflamatório, foram constatadas, ainda, a colangiofibrose, peliose e a espongiose, bem como a presença, em determinados casos, de lesões neoplásicas benignas e de carcinoma hepatocelular com padrão trabecular ou glandular (**Quadro 1**).

5.5.2 Observação Específica

Grupo OM

Foram estudados os fígados de 8 ratos deste grupo, e os animais apresentaram lesões pré-neoplásicas (focos e nódulos) distinguíveis nos cortes corados por H & E, principalmente de *células claras* e *mistos*. Discreta a moderada inflamação peri-portal foi constatada, além de discreta degeneração vacuolar em hepatócitos peri-portais. Lesões neoplásicas benignas e malignas foram observadas, bem como outras lesões hepáticas, conforme apresentado no **Quadro 1** a seguir.

Grupo β C

Foram estudados os fígados de 8 ratos deste grupo. Estes apresentaram focos e nódulos pré-neoplásicos distinguíveis nos cortes corados por H & E, principalmente de *células claras* e *mistos*. Discreta a moderada inflamação peri-portal foi constatada, além de discreta degeneração vacuolar em hepatócitos peri-portais. Lesões neoplásicas benignas e malignas foram observadas, bem como outras lesões hepáticas, conforme apresentado a seguir no **Quadro 1**.

Grupo VA

Foram estudados os fígados de 8 ratos deste grupo. Estes apresentaram focos e nódulos de hepatócitos distinguíveis nos cortes corados por H & E, principalmente de *células claras* e *mistos*. Discreta a moderada inflamação peri-portal foi constatada, além de discreta degeneração vacuolar em hepatócitos peri-portais. Lesões neoplásicas benignas e malignas foram vistas, bem como outras lesões hepáticas, conforme apresentado no **Quadro 1** a seguir.

Quadro 1. Incidência e descrição das lesões neoplásicas benignas e malignas, bem como de outras lesões hepáticas, de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Grupo	Incidência (%) e Tipos de lesões neoplásicas benignas	Incidência (%) e Tipos de lesões neoplásicas malignas	Incidência (%) e Tipos de outras lesões hepáticas
OM	62,5% - Colangioma cístico (50%) - Adenoma hepatocelular (62,5%)	62,5% - Carcinoma hepatocelular padrão trabecular (37,5%) - Carcinoma hepatocelular padrão glandular (25,0%)	- Colangiofibrose (12,5%) - Peliose (37,5%)
βC	75% - Colangioma cístico (50%) - Adenoma hepatocelular (50%)	25,0% - Carcinoma hepatocelular padrão trabecular (25,0%)	- Colangiofibrose (25%) - Peliose (25%) - Espongiose (37,5%)
VA	37,5% - Colangioma cístico (25%) - Adenoma hepatocelular (25%)	25,0% - Carcinoma hepatocelular padrão trabecular (25,0%)	- Colangiofibrose (12,5%) - Espongiose (50%)

Observa-se no **Quadro 1** que o grupo de animais tratados com β -caroteno (grupo β C) por 8 semanas consecutivas e sacrificados na 48ª semana do experimento, ou seja, na fase de progressão da hepatocarcinogênese, apresentou maior incidência (75%) de lesões hepáticas benignas do que o grupo de ratos tratados com óleo de milho durante o mesmo período (62,5%) (grupo OM — controles). Todavia, constata-se ainda nesse Quadro, que a incidência de colangioma cístico foi idêntica (50%) nesses dois grupos experimentais, e que ratos tratados com o carotenóide (grupo β C) apresentaram menor incidência (50%) de adenoma hepatocelular do que animais tratados com óleo de milho (62,5%) (grupo OM).

Observou-se também menor incidência (25%) de peliose no grupo β C do que no grupo OM (37,5%), embora o grupo de animais tratados com β -caroteno (grupo β C) tenha apresentado maior incidência (25%) de colangiofibrose do que o grupo de ratos aos quais se administrou apenas óleo de milho (12,5%) (grupo OM). Além disso, a incidência de espongiose foi de 37,5% no grupo β C, não tendo sido observada esta lesão hepática no grupo OM.

Por outro lado, constata-se também no **Quadro 1** que a incidência de carcinomas foi menor (25,0%) no grupo de ratos tratados por 8 semanas consecutivas com β -caroteno (grupo

β C) e sacrificados 12 meses após aplicação do carcinogênico iniciante DEN, do que no grupo controle (62,5%) (grupo OM).

Resultados semelhantes a estes foram também observados em animais tratados com vitamina A.

Assim, ainda de acordo com o **Quadro 1**, constata-se que o grupo de ratos que recebeu esse retinóide da 40ª à 48ª semana do estudo (grupo VA), apresentou uma menor (25,0%) incidência de carcinomas do que o grupo controle (62,5%) (grupo OM — controles).

Além disso, o grupo de ratos tratados com a vitamina A por 8 semanas consecutivas durante a fase de progressão do modelo do RH (grupo VA) também apresentou menor (37,5%) incidência de neoplasias benignas do que o grupo controle (62,5%) (grupo OM), incluindo estas lesões tanto o colangioma cístico como o adenoma hepatocelular. Por outro lado, observou-se incidência idêntica (12,5%) de colangiofibrose nesses dois grupos experimentais. A incidência de espongiose observada no grupo VA correspondeu a 50%, enquanto este tipo de lesão não foi constatado no fígado dos animais do grupo controle (grupo OM).

5.6 Avaliação das Concentrações Hepáticas de β -caroteno e Retinol

A **Tabela 4** apresenta os resultados relativos às concentrações hepáticas de β -caroteno e retinol (vitamina A) determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em fígados de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados da 40ª à 48ª semana do estudo com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA), durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Tabela 4. Concentrações hepáticas de β -caroteno e retinol, de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Grupo	(n)	Concentração hepática de β -caroteno* (μ g/g)	Concentração hepática de retinol* (μ g/g)
OM	6	n. d.	933,55 $\pm$ 458,7
β C	6	0,65 $\pm$ 0,17	1196,90 $\pm$ 316,5
VA	6	n. d.	5896,01 $\pm$ 138,2 ^{a,b}

* = os valores representam, respectivamente, média $\pm$ desvio padrão da média.

n = número de animais.

n. d. = não-detectável.

A significância ($p < 0,05$) entre as diferenças das médias foi determinada pelo teste de Mann Whitney para amostras não-pareadas:

a = diferente estatisticamente do grupo OM;

b = diferente estatisticamente do grupo β C.

Pode-se observar nessa **Tabela** que foram detectadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), quantidades mensuráveis de β -caroteno no fígado dos animais tratados com esse carotenóide por 8 semanas consecutivas e sacrificados 12 meses após aplicação da DEN (grupo β C), ao contrário do que ocorreu nos grupos OM (controles) e VA, e que contaram apenas com suas rações como única fonte de β -caroteno, durante esse mesmo período. Além disso, por ocasião do sacrifício ao término da 48ª semana do estudo, os ratos do grupo β C tenderam a apresentar maiores concentrações hepáticas de retinol do que os animais do grupo controle (grupo OM), embora essa diferença não tenha alcançado, neste caso, significância do ponto de vista estatístico.

Por outro lado, observa-se ainda na **Tabela 4** que animais tratados por 8 semanas consecutivas com vitamina A e sacrificados 12 meses após realização do processo de iniciação com a DEN (grupo VA), apresentaram concentrações hepáticas de retinol significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os dois outros grupos experimentais, ou seja, do que o grupo OM (controles) e o grupo β C.

5.7 Avaliação da Proliferação Celular Hepática

A quantificação da proliferação celular no fígado pode ser realizada através de métodos bioquímicos que determinam as concentrações de DNA no tecido, ou métodos histológicos capazes de demonstrarem células que incorporaram no DNA de seus núcleos (índice de marcação) durante a síntese desse ácido nucleico, por exemplo, a base 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrDU), um análogo da timidina (**Figura 4**).

Assim, a **Tabela 5** demonstra os resultados das determinações das concentrações hepáticas de DNA realizadas através de método bioquímico, de animais submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) por oito semanas consecutivas durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Tabela 5. Concentrações hepáticas de DNA de animais submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Grupos	n	Concentração hepática de DNA em mg/g*
OM	6	2,23 $\pm$ 0,12
β C	6	1,82 $\pm$ 0,07 ^a
VA	6	1,54 $\pm$ 0,16 ^a

* = os valores representam, respectivamente, média $\pm$ desvio padrão da média.

n = número de animais.

A significância ($p < 0,05$) entre as diferenças das médias foi determinada pelo teste de Mann Whitney para amostras não-pareadas:

a = diferente estatisticamente do grupo OM.

Pode-se observar na **Tabela 5** que ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) apresentaram menores ($p < 0,05$) concentrações hepáticas de DNA do que seus respectivos controles (grupo OM), ou seja, do que aqueles animais tratados com óleo de milho e também sacrificados 12 meses após realização do processo de iniciação com a DEN.

Já a **Tabela 6** apresenta os resultados relativos ao índice de marcação com a BrDU, das áreas hepáticas consideradas "normais" ao redor das lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas à macroscopia, bem como das próprias lesões, de fígados de animais submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados durante 8 semanas consecutivas, com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A, em fase propícia ao desenvolvimento de cânceres. Além disso, pode-se ainda observar nessa **Tabela**, o valor relativo ao índice de marcação de animais que não foram submetidos a esse modelo de hepatocarcinogênese ou a qualquer outro tipo de tratamento, mas que permaneceram na mesma sala em que ficaram os ratos dos outros grupos experimentais, até serem sacrificados ao término da 48ª semana do estudo.

Tabela 6. Índice de marcação com a BrDU, de amostras de fígado de ratos normais (nenhum tratamento), bem como de áreas "normais" ao redor das lesões, e das próprias lesões, de animais submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A por 8 semanas consecutivas, durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Tratamento	n	Índice de marcação da área "normal" ao redor das lesões ^a	n	Índice de marcação das lesões (nódulos persistentes/cânceres) ^a
Nenhum	4	$0,03 \pm 0,05^a$	-	-
Óleo de milho	8	$0,32 \pm 0,10$	7	$2,87 \pm 1,8^b$
β -Caroteno	8	$0,11 \pm 0,08^a$	7	$1,05 \pm 1,1^{a,b}$
Vitamina A	8	$0,11 \pm 0,14^a$	4	$0,72 \pm 0,9$

* = os valores representam, respectivamente, média $\pm$ desvio padrão da média.

n = número de animais.

A significância ($p < 0,05$) entre as diferenças das médias foi determinada pelo teste de Mann Whitney para amostras não-pareadas:

a = diferente estatisticamente do grupo de animais tratados com óleo de milho;

b = diferente estatisticamente do índice de marcação da respectiva área "normal" ao redor das lesões.

Pode-se constatar nessa **Tabela** que o índice de marcação com a BrDU da área considerada "normal" ao redor das lesões à macroscopia, de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho, foi maior ($p < 0,05$) do que o índice de marcação de animais não submetidos a esse modelo de hepatocarcinogênese ou a qualquer outro tratamento (nenhum tratamento). Além disso, observa-se também nessa **Tabela 6** que os índices de marcação com a BrDU das áreas consideradas "normais" ao redor das lesões, de animais tratados com β -caroteno ou vitamina A durante 8 semanas consecutivas em fase do modelo de hepatocarcinogênese propícia ao desenvolvimento de cânceres, foram menores ($p < 0,05$) do que o índice de marcação da área "normal" dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho da 40^a à 48^a semana do estudo.

Da mesma forma, constata-se ainda nessa **Tabela** que o índice de marcação com a BrDU das áreas das lesões (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com β -caroteno, foi menor ($p < 0,05$) do que o índice de marcação das áreas das lesões do grupo de animais tratados com óleo de milho, sacrificados 12 meses após aplicação do carcinogênico iniciante DEN. Resultados semelhantes quanto ao índice de marcação com a BrDU na área das lesões foram também observados em ratos tratados com a vitamina A, embora a diferença não tenha alcançado, neste caso, significância estatística quando em comparação ao índice de marcação da área das lesões do grupo de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho.

Finalmente, pode-se ainda observar na **Tabela 6** que os índices de marcação com a BrDU das áreas de lesões (nódulos persistentes/cânceres) foram maiores ($p < 0,05$) do que os índices de marcação das respectivas áreas consideradas "normais" ao redor das lesões à macroscopia, tanto no grupo de animais tratados com óleo de milho como no grupo de ratos tratados com (caroteno na fase de progressão do modelo do RH. Além disso, apesar de haver também uma tendência nesse sentido no grupo de animais tratados por 8 semanas consecutivas com vitamina A nessa etapa da hepatocarcinogênese, a diferença não atingiu, entretanto, neste caso, significância do ponto de vista estatístico (**Tabela 6**).

5.8 Padrão de Metilação dos proto-oncogenes *c-Ha-ras*, *c-myc*, bem como do Gene que Codifica para a Enzima HMGC_oA Redutase

Para a avaliação do padrão de metilação dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, bem como do gene que codifica para a enzima HMGC_oA redutase, foram utilizadas amostras de fígado coletadas de áreas consideradas "normais" ao exame Macroscópico, bem como de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas cuidadosamente separadas do tecido hepático circundante por ocasião do sacrifício, de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" (RH) e tratados por 8 semanas consecutivas com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**), durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese. Além disso, utilizou-se, nesse sentido, e para efeito de comparação, amostras de fígado de ratos que não foram submetidos ao modelo do RH ou a quaisquer outros tratamentos (ratos normais) até a ocasião de seus sacrifícios, também ao término da 48ª semana do estudo.

Após extração do DNA genômico dessas amostras, este foi digerido por 3 horas consecutivas com a enzima de restrição *Hpa* II ou *Msp* I. A seguir, analisou-se o padrão dos fragmentos resultantes, separados mediante eletroforese em gel de agarose e transferidos para membrana de nitrocelulose com suporte, empregando-se, por ocasião das hibridizações, sondas para os proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, bem como para o gene que codifica para a enzima HMGC_oA redutase.

Assim, as **Figuras 6 e 7** demonstram o padrão de metilação do proto-oncogene *c-Ha-ras* do DNA extraído de amostras de fígado de ratos normais, bem como de animais dos grupos **OM** (controles), **β C** e **VA** sacrificados ao término da 48ª semana do estudo, digerido com a enzima de restrição *Hpa* II ou *Msp* I, respectivamente.

Pode-se constatar na **Figura 6** que a digestão com a enzima de restrição *Hpa* II, do DNA extraído de amostras de fígado de ratos não submetidos a quaisquer tratamentos (ratos normais), bem como de amostras de áreas consideradas "normais" ao exame macroscópico e de lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais submetidos ao modelo do RH e tratados por 8 semanas consecutivas com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**) da 40ª à 48ª semana do estudo, resultou, basicamente, em seis fragmentos distintos marcados pela sonda para o proto-oncogene *c-Ha-ras*. Estes apresentavam uma distribuição por tamanho e intensidade de marcação pela sonda semelhante em todas as amostras, sendo dois maiores do que 23 kb, dois apresentando tamanhos compreendidos entre 9,4 e 23 kb, um entre 6,5 e 9,4 kb, e um com tamanho menor do que 2,0 kb.

Figura 6. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas **a** e **b**), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas **c**, **d** e **e**) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas **f** [nódulo persistente], **g** e **h** [cânceres]), β -caroteno (colunas **i** [nódulo persistente], **j** e **l** [cânceres]) ou vitamina A (colunas **m** [nódulo persistente], **n** e **o** [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”, digeridos com a enzima *Hpa* II e hibridizados com sonda para o proto-oncogene *c-Ha-ras*.

Figura 7. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas **a** e **b**), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas **c**, **d** e **e**) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas **f** [nódulo persistente], **g** e **h** [cânceres]), β -caroteno (colunas **i** [nódulo persistente], **j** e **l** [cânceres]) ou vitamina A (colunas **m** [nódulo persistente], **n** e **o** [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”, digeridos com a enzima *Msp* I e hibridizados com sonda para o proto-oncogene *c-Ha-ras*.

FIGURA 6

FIGURA 7

Já na **Figura 7** observa-se que a digestão com a enzima de restrição *Msp* I dessas mesmas amostras de DNA também resultou, nas amostras coletadas de fígados de ratos não submetidos a quaisquer tratamentos (colunas **a** e **b**), bem como de áreas hepáticas obtidas dos três outros grupos experimentais (grupos **OM**, **β C** e **VA**) e consideradas "normais" à macroscopia (colunas **c**, **d** e **e**), em dez fragmentos distintos marcados pela sonda para o proto-oncogene *c-Ha-ras*, sendo dois deles maiores do que 23 kb, um apresentando tamanho compreendido entre 9,4 e 23 kb, um com tamanho entre 6,5 e 9,4 kb, um entre 4,3 e 6,5 kb, um entre 2,0 e 2,3 kb e quatro fragmentos menores do que 2,0 kb, estes últimos marcados bem mais intensamente pela sonda.

Por outro lado, nas amostras de DNA extraído de lesões hepáticas (nódulo persistente e cânceres) de ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho (grupo **OM** — controles), a digestão com a enzima de restrição *Msp* I resultou apenas em quatro fragmentos em duas delas (nódulo persistente e câncer; colunas **f** e **g**), um com tamanho compreendido entre 2,0 e 2,3 kb e três menores do que 2,0 kb, bem como em três bandas em uma das amostras (câncer; coluna **h**), uma delas com tamanho entre 2,0 e 2,3 kb e duas menores do que 2,0 kb (**Figura 7**). Nestas três amostras, as bandas menores do que 2,0 kb também se encontravam marcadas mais intensamente pela sonda para o proto-oncogene *c-Ha-ras*.

Este padrão de metilação do proto-oncogene *c-Ha-ras* após digestão com a enzima de restrição *Msp* I do DNA extraído de amostras de lesões hepáticas (nódulo persistente e cânceres) do grupo **OM** (controles) foi também observado em uma amostra de DNA extraído de lesão hepática (câncer) de animal submetido ao modelo de hepatocarcinogênese e tratado da 40ª à 48ª semana do estudo com β -caroteno (grupo **β C**; coluna **j**) e em uma amostra (câncer) de rato tratado com vitamina A (grupo **VA**) (**Figura 7**; coluna **n**).

Em contraste, constatou-se em duas amostras de DNA extraído de lesões hepáticas (nódulo persistente e câncer) coletadas de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com β -caroteno (grupo **β C**; colunas **i** e **l**) durante fase desse modelo de hepatocarcinogênese propícia ao desenvolvimento de neoplasias malignas, bem como em duas amostras de DNA extraído de lesões hepáticas (nódulo persistente e câncer) de animais também submetidos ao modelo do RH e tratados com vitamina A (grupo **VA**; colunas **m** e **o**) durante a mesma fase do estudo, um padrão de metilação do proto-oncogene *c-Ha-ras* após digestão com a enzima *Msp* I, semelhante ao observado após digestão do DNA com essa mesma enzima de restrição, extraído a partir de amostras de fígado de ratos não submetidos a quaisquer tratamentos (ratos normais; colunas **a** e **b**) ou de áreas consideradas "normais" à macroscopia (colunas **c**, **d** e **e**), colhidas de ratos submetidos ao modelo do RH (grupos **OM**, **β C** e **VA**) e também sacrificados ao término da 48ª semana do estudo (**Figura 7**).

Procurando-se avaliar se foi suficiente para uma digestão adequada o período de 3 horas utilizado no presente estudo para a digestão tanto com a enzima de restrição *Hpa* II como com a enzima *Msp* I, realizou-se um experimento em que se empregou DNA extraído de amostra de área hepática considerada "normal" ao exame macroscópico (**Figura 8**), de animal submetido ao modelo do "hepatócito resistente" e tratado com vitamina A (grupo **VA**), bem como DNA extraído de amostra de lesão pré-neoplásica (nódulo persistente) de rato submetido ao modelo do RH e tratado com β -caroteno (**Figura 9**), os quais foram digeridos com uma ou outra enzima de restrição por períodos que variaram de 1 a 6 horas, respectivamente.

A seguir, os fragmentos de DNA resultantes foram separados através de eletroforese em gel de agarose, transferidos para membrana de nitrocelulose e hibridizados com sonda para o proto-oncogene *c-Ha-ras*, marcada com ^{32}P .

Os resultados desse experimento estão apresentados nas **Figuras 8 e 9**.

Figura 8. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, do DNA extraído de amostra de tecido ao redor de lesões hepáticas de rato tratado com vitamina A durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente", digerido por períodos que variaram de 1 a 6 horas com a enzima *Hpa* II ou *Msp* I e hibridizado com sonda para o proto-oncogene *c-Ha-ras*.

Figura 9. Digitalização de autorradiografia apresentando padrões de fragmentos de restrição, do DNA extraído de nódulo persistente de hepatócitos de rato tratado com β -caroteno durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente", digerido por períodos que variaram de 1 a 6 horas com a enzima *Hpa* II ou *Msp* I e hibridizado com sonda para o proto-oncogene *c-Ha-ras*.

FIGURA 8

FIGURA 9

Assim, pode-se observar nessas **Figuras** padrões de metilação do proto-oncogene *c-Ha-ras* após digestão com a enzima *Hpa* II ou *Msp* I semelhantes aos apresentados nas **Figuras 6 e 7** após digestão com as mesmas enzimas, de amostras de DNA extraído de áreas hepáticas consideradas "normais" ao exame macroscópico, bem como de lesões hepáticas de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**) da 40ª à 48ª semana do estudo. Além disso, pode-se ainda constatar nas **Figuras 8 e 9** que os padrões de metilação do proto-oncogene *c-Ha-ras* foram praticamente os mesmos após os diversos períodos de digestão que variaram de 1 a 6 horas, tanto com a enzima de restrição *Hpa* II como com a enzima *Msp* I, respectivamente.

Após hibridização com a sonda para o proto-oncogene *c-Ha-ras*, as membranas de nitrocelulose com suporte contendo as amostras de DNA extraído de animais normais sacrificados ao término da 48ª semana do estudo e de ratos em fase do modelo do RH propícia ao desenvolvimento de cânceres, e digerido com a enzima de restrição *Hpa* II (**Figura 6**) ou *Msp* I (**Figura 7**), foram, a seguir, lavadas e subsequentemente hibridizadas com a sonda para o proto-oncogene *c-myc*.

Os resultados dessas hibridizações encontram-se ilustrados nas **Figuras** de números **10 e 11**.

Assim, pode-se observar na **Figura 10**, que a digestão com a enzima *Hpa* II do DNA das amostras de fígado colhidas de ratos não submetidos a quaisquer tratamentos (ratos normais), bem como de regiões hepáticas consideradas "normais" ao exame macroscópico de animais submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e sacrificados ao término da 48ª semana do estudo após tratamento por oito semanas consecutivas com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**), resultou, basicamente, em sete fragmentos (bandas) distintos de DNA marcados pela sonda para o proto-oncogene *c-myc*, sendo um deles maior do que 6,5 kb, dois com tamanhos compreendidos entre 4,3 e 6,5 kb, dois com tamanhos entre 2,3 e 4,3 kb, e em dois fragmentos menores do que 2,0 kb. Estes últimos se apresentaram marcados bem menos intensamente pela sonda do que os cinco anteriores.

Por outro lado, pode-se ainda constatar nessa **Figura 10** que a digestão com a enzima de restrição *Hpa* II, do DNA extraído de lesões hepáticas (nódulos persistentes e cânceres) colhidas de animais submetidos ao modelo do RH e sacrificados 12 meses após realização do processo de iniciação, independente do tratamento a que estes foram submetidos resultou apenas em quatro desses sete fragmentos, dois deles com tamanhos compreendidos entre 2,3 e 4,3 kb, e dois menores do que 2,0 kb.

Além disso, pode-se observar na **Figura 11** que a digestão agora com a enzima de restrição *Msp* I dessas mesmas amostras de DNA extraído de fígado de ratos não submetidos a quaisquer tratamentos (ratos normais; colunas **a e b**) e de áreas consideradas "normais" ao exame macroscópico (colunas **c, d e e**), de animais submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados durante a fase de progressão do modelo do RH com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**), resultou em nove diferentes fragmentos marcados pela sonda para o proto-oncogene *c-myc*, sete deles com aproximadamente os mesmos tamanhos que os fragmentos resultantes da digestão com a enzima de restrição *Hpa* II dessas mesmas amostras de fígado (**Figura 10**), e dois outros fragmentos com tamanhos compreendidos entre 2,0 e 2,3 kb.

Por outro lado, a digestão com a enzima de restrição *Msp* I do DNA extraído de lesões hepáticas, resultou em apenas uma banda marcada pela sonda para o proto-oncogene *c-myc* menor do que 2,0 kb em 3 amostras de lesões (nódulo persistente e cânceres) coletadas de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho (grupo **OM** — controles; colunas **f, g e h**) da 40ª à 48ª semana do estudo, bem como em uma amostra de lesão (câncer) obtida de animal

tratado com β -caroteno (grupo β C; coluna j) e em uma amostra (câncer) coletada de rato tratado com vitamina A (grupo VA; coluna n), também durante essa mesma fase do estudo (**Figura 11**).

Além disso, em duas amostras de DNA extraído de lesões hepáticas (nódulo persistente e câncer) e digerido com a enzima de restrição *Msp* I, de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com β -caroteno (grupo β C; colunas i e l), bem como em duas amostras de DNA de lesões (nódulo persistente e câncer) coletadas de ratos também submetidos a esse modelo de hepatocarcinogênese mas tratados com vitamina A (grupo VA; colunas m e o), constatou-se a presença de duas bandas menores do que 2,0 kb marcadas nitidamente pela sonda para o gene *c-myc*, bem como de dois outros fragmentos com tamanhos compreendidos entre 2,3 e 4,3 kb. Observou-se, ainda, nessas quatro amostras, a presença de um fragmento marcado tenuemente pela sonda, e com tamanho compreendido entre 2,0 e 2,3 kb (**Figura 11**).

Após as hibridizações com as sondas para os proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, as membranas de nitrocelulose com suporte contendo as amostras de DNA extraído de animais normais e de ratos sacrificados em fase do modelo do RH propícia à constatação da presença de cânceres e digerido com as enzimas de restrição *Hpa* II (**Figuras 6 e 10**, respectivamente) ou *Msp* I (**Figuras 7 e 11**, respectivamente), foram, a seguir, lavadas e subsequentemente hibridizadas com a sonda para o gene que codifica para a enzima HMGC_oA redutase.

Figura 10. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas **a** e **b**), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas **c**, **d** e **e**) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas **f** [nódulo persistente], **g** e **h** [cânceres]), β -caroteno (colunas **i** [nódulo persistente], **j** e **l** [cânceres]) ou vitamina A (colunas **m** [nódulo persistente], **n** e **o** [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”, digeridos com a enzima *Hpa* II e hibridizados com sonda para o proto-oncogene *c-myc*.

Figura 11. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas **a** e **b**), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas **c**, **d** e **e**) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas **f** [nódulo persistente], **g** e **h** [cânceres]), β -caroteno (colunas **i** [nódulo persistente], **j** e **l** [cânceres]) ou vitamina A (colunas **m** [nódulo persistente], **n** e **o** [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do “hepatócito resistente”, digeridos com a enzima *Msp* I e hibridizados com sonda para o proto-oncogene *c-myc*.

FIGURA 10

FIGURA 11

Assim, as **Figuras 12 e 13** demonstram o padrão de metilação do gene para a enzima HMGC α redutase, após digestão com a enzima de restrição *Hpa* II ou *Msp* I, respectivamente, do DNA extraído de amostras de fígado coletadas de animais sacrificados ao término da 48ª semana do estudo.

Pode-se observar na **Figura 12** que a digestão com a enzima de restrição *Hpa* II, do DNA extraído de amostras colhidas de fígados de ratos não submetidos a quaisquer tratamentos (ratos normais) e sacrificados ao término da 48ª semana do estudo, resultou, basicamente, em seis fragmentos marcados mais intensamente pela sonda para o gene da enzima HMGC α redutase, um deles maior do que 23 kb, três com tamanhos compreendidos entre 9,4 e 23 kb e dois menores do que 2 kb.

Além disso, a digestão com a enzima de restrição *Hpa* II, do DNA extraído de áreas hepáticas consideradas "normais" à macroscopia, de animais submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados por 8 semanas consecutivas com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**), resultou, independentemente do tratamento a que estes foram submetidos, em oito fragmentos (bandas) marcados mais intensamente pela sonda para o gene que codifica para a enzima HMGC α redutase, um deles maior do que 23 kb, três com tamanhos compreendidos entre 9,4 e 23 kb, dois entre 6,5 e 9,4 kb e dois menores do que 2 kb (**Figura 12**).

Por outro lado, a digestão com a enzima de restrição *Hpa* II do DNA extraído de amostras de lesões hepáticas (nódulos persistentes e cânceres) de ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**) durante a fase de progressão do modelo do RH, resultou, também independentemente do tratamento a que estes foram submetidos, em dez fragmentos distintos marcados pela sonda para o gene que codifica para a enzima HMGC α redutase, sendo um deles maior do que 23 kb, três com tamanhos compreendidos entre 9,4 e 23 kb, dois entre 6,5 e 9,4 kb, dois entre 2,3 e 4,3 kb, um entre 2,0 e 2,3 kb e um bem menor do que 2,0 kb (**Figura 12**).

Já a digestão com a enzima de restrição *Msp* I, do DNA extraído dessas mesma amostras de fígado de um dos ratos não submetido a quaisquer tratamentos (rato normal; coluna **a**) e sacrificado ao término da 48ª semana do estudo, bem como de áreas hepáticas consideradas "normais" à macroscopia (colunas **c**, **d** e **e**), de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**) por oito semanas consecutivas (**Figura 13**), resultou em onze fragmentos distintos marcados pela sonda para o gene da enzima HMGC α redutase. Dez destes foram também constatados após digestão com a enzima de restrição *Hpa* II, embora de amostras de DNA extraídas de lesões hepáticas (nódulos persistentes e cânceres) de animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com óleo de milho (grupo **OM** — controles), β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**) da 40ª à 48ª semana do estudo (**Figura 12**), sendo a única exceção um fragmento com tamanho pouco menor do que 2,0 kb.

Além disso, o padrão de metilação do gene que codifica para a enzima HMGC α redutase após digestão com a enzima *Msp* I do DNA extraído de amostra de fígado de um outro rato não submetido a quaisquer tratamentos e sacrificado ao término da 48ª semana do estudo (coluna **b**), foi semelhante ao descrito acima para amostra de DNA digerida com essa enzima de restrição e extraída também de fígado de rato normal sacrificado na mesma etapa do estudo, exceto pelo fato de não se constatar, neste caso, a presença da banda bem menor do que 2,0 kb (**Figura 13**).

Figura 12. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas **a** e **b**), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas **c**, **d** e **e**) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas **f** [nódulo persistente], **g** e **h** [cânceres]), β -caroteno (colunas **i** [nódulo persistente], **j** e **l** [cânceres]) ou vitamina A (colunas **m** [nódulo persistente], **n** e **o** [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente", digeridos com a enzima *Hpa* II e hibridizados com sonda para o gene que codifica para a enzima HMGC_oA redutase.

Figura 13. Digitalização de autorradiografia demonstrando padrões de fragmentos de restrição, dos DNAs extraídos de amostras de fígado de ratos normais (colunas **a** e **b**), do tecido hepático ao redor de lesões (colunas **c**, **d** e **e**) e das próprias lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais tratados com óleo de milho (colunas **f** [nódulo persistente], **g** e **h** [cânceres]), β -caroteno (colunas **i** [nódulo persistente], **j** e **l** [cânceres]) ou vitamina A (colunas **m** [nódulo persistente], **n** e **o** [cânceres]) durante a fase de progressão do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente", digeridos com a enzima *Msp* I e hibridizados com sonda para o gene que codifica para a enzima HMGC_oA redutase.

FIGURA 12

FIGURA 13

Pode-se ainda observar na **Figura 13** que em duas amostras de DNA extraído de lesões hepáticas (nódulo persistente e câncer) e digerido com a enzima de restrição *Msp* I, de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com β -caroteno (grupo β C; colunas i e l) durante fase desse modelo propícia ao desenvolvimento de cânceres, bem como em 2 amostras de DNA extraído de lesões hepáticas (nódulo persistente e câncer) de ratos também submetidos a esse modelo de hepatocarcinogênese mas tratados com vitamina A (grupo VA; colunas m e o), o padrão de metilação do gene que codifica para a enzima HMGC_oA redutase foi praticamente idêntico ao observado após digestão com a enzima *Msp* I, do DNA extraído de amostras de fígado de rato não submetido a quaisquer tratamentos (rato normal), bem como de amostras de áreas hepáticas consideradas "normais" ao exame macroscópico, de animais submetidos ao modelo do RH e sacrificados 12 meses após aplicação do carcinogênico iniciante DEN.

Portanto, constata-se também nesses casos, a presença de 11 fragmentos distintos marcados pela sonda para o gene da HMGC_oA redutase, variando em tamanho desde um fragmento maior do que 23 kb até um bem menor do que 2,0 kb (**Figura 13**).

Por outro lado, como se pode ainda observar na **Figura 13**, a digestão com a enzima *Msp* I do DNA extraído das três amostras de lesões hepáticas (nódulo persistente e cânceres) de animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles; colunas f, g e h) da 40^a à 48^a semana do estudo, bem como de uma amostra de lesão hepática (câncer) de animal também submetido ao modelo do RH e tratado com β -caroteno (grupo β C; coluna j) na mesma fase do estudo e de uma amostra de lesão hepática (câncer) de rato tratado com vitamina A (grupo VA; coluna n), resultou em um padrão de metilação do gene que codifica para a enzima HMGC_oA redutase com os fragmentos de tamanho aproximado ou menores do que 9,4 kb marcados mais intensamente pela sonda, e com as bandas próximas a 23 kb marcadas de forma já bem mais tênue ou, inclusive, não-marcadas.

6. DISCUSSÃO

Um dos intúitos básicos do presente estudo foi o de avaliar em ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" (RH), a existência de eventuais efeitos inibitórios em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas por parte do β -caroteno ou da vitamina A, quando administrados especificamente durante a etapa de progressão da hepatocarcinogênese.

Para tanto, deu-se início às aplicações do carotenóide ou do retinóide na 40ª semana após administração do carcinogênico iniciante dietilnitrosamina (DEN) e que se estenderam por oito semanas consecutivas, quando então os animais foram sacrificados.

Não foram constatadas, nessa ocasião, diferenças estatisticamente significantes entre os pesos corpóreos dos ratos dos três grupos experimentais (grupos **OM** — controles; **β C** e **VA**) (Tabela 1), o que sugere que os diferentes resultados relativos aos diversos parâmetros analisados no presente estudo e observados, eventualmente, tanto após o tratamento com β -caroteno como com a vitamina A, não devem ser atribuídos à ocorrência de alterações no balanço calórico dos animais.

6.1 Sobre a Quantificação à Macroscopia das Lesões Pré-neoplásicas e Neoplásicas Presentes nos Fígados de Ratos Wistar Submetidos ao Modelo do "Hepatócito Resistente" e Tratados com Óleo de Milho, β -Caroteno ou Vitamina A Durante a Fase de Progressão da Hepatocarcinogênese.

Tanto em seres humanos como em animais a ocorrência do câncer em muitos sítios é usualmente precedida pelo desenvolvimento de lesões proliferativas focais pré-neoplásicas, tais como papilomas, pólipos ou nódulos (FARBER, 1990).

No fígado, da mesma forma que na maioria de outros tecidos e órgãos, pode-se observar um longo período de latência entre a exposição inicial a um carcinogênico químico apropriado, à radiação ou a um DNA vírus, e as primeiras evidências do câncer. Durante essa evolução prolongada, um achado constante tanto em roedores como em humanos é o aparecimento de proliferações focais ou nódulos, compostos de hepatócitos e ductos biliares ocasionais (FARBER, 1990; SUGITANI *et al.*, 1998).

Demostrou-se em diversos estudos, de forma convincente, que o hepatocarcinoma surge justamente no interior de tais nódulos de hepatócitos (FARBER, 1990).

Assim, baseado na evidência obtida a partir de diversos modelos de carcinogênese hepática no rato através da utilização de vários carcinogênicos químicos e promotores ou até mesmo de restrição de colina na ração (FARBER e SARMA, 1987; WU e MORENO, 1998), observou-se a ocorrência de um padrão de desenvolvimento do câncer hepático consistindo, basicamente, nas duas seguintes sequências fundamentais: (A) na gênese de proliferações focais benignas de hepatócitos (*focos* e *nódulos*) provavelmente por expansão clonal, e das quais apenas uma pequena quantidade persiste, demonstrando proliferação espontânea de hepatócitos mas sem outras evidências de neoplasia, incluindo o câncer; e (B) na evolução muito lenta de certa quantidade de proliferações focais persistentes de hepatócitos (*nódulos persistentes* de hepatócitos, "adenomas") através de um processo em múltiplas etapas na direção de um carcinoma hepatocelular com características citológicas e histoquímicas típicas de malignidade, bem como com invasão e aparecimento de metástases (FARBER *et al.*, 1988).

Em vários modelos de hepatocarcinogênese pode-se observar que essas duas sequências de evolução se sobrepõe, de modo que é praticamente impossível a determinação

de que etapa precede ou se segue a qualquer outra fase da carcinogênese (FARBER *et al.*, 1988). Além disso, pode-se ainda constatar que as etapas essenciais dessas sequências são representadas pela indução inicial de um novo fenótipo (e também provavelmente um novo genótipo) em um raro hepatócito (*iniciação*), bem como pela expansão clonal subsequente dessas poucas células alteradas para produzirem proliferações focais benignas persistentes, ou seja, nódulos de hepatócitos (*promoção*). Portanto, a formação dessas lesões no fígado constitui um reflexo do desenvolvimento clássico da carcinogênese química através das etapas de iniciação e promoção (FARBER, 1984a; SARMA e FARBER, 1987; FARBER, 1990).

Nesse sentido, estima-se que no rato o processo de iniciação da hepatocarcinogênese com vários carcinogênicos químicos esteja associado ao aparecimento constitutivo em um raro hepatócito (1 a cada 10^5 - 10^6 hepatócitos), de um novo fenótipo denominado de *resistência*, com padrão bioquímico altamente característico. Este inclui pronunciadas reduções nas atividades de enzimas ou hemoproteínas (por exemplo citocromos P-450) que ativam carcinogênicos e outros xenobióticos (enzimas de fase I) e aumentos apreciáveis de atividades de enzimas (gama-glutamiltanspeptidase, glutathione-S-transferases) e outros componentes (glutathione) ativos na detoxificação (enzimas de fase II) (FARBER, 1984a; 1990; ROOMI *et al.*, 1985; FARBER *et al.*, 1988).

O fenótipo dos hepatócitos iniciados nesse animal não inclui, por sua vez, qualquer grau mensurável de proliferação celular espontânea ou autônoma. Portanto, não ocorre expansão das células iniciadas individuais, até que seja criado um ambiente adequado graças a um regime de promoção (FARBER e RUBIN, 1991).

A única forma conhecida disto acontecer no fígado do rato é proporcionando um estímulo geral à proliferação celular em que os hepatócitos iniciados são estimulados, ao mesmo tempo em que é inibida a proliferação de todos os outros hepatócitos normais, ou seja, através de um processo denominado de *inibição diferencial* (FARBER *et al.*, 1988).

Esta consiste justamente na base do modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente", em que o fígado é estimulado a proliferar através de uma hepatectomia parcial ou por uma dose de algum agente necrogênico como o tetracloreto de carbono após a aplicação de um carcinogênico iniciante como a dietilnitrosamina (DEN), ao mesmo tempo em que é exposto a carcinogênicos como o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), e que possibilitam que apenas os hepatócitos resistentes proliferem seletivamente para gerar nódulos (SOLT e FARBER, 1976; FARBER, 1984a; FARBER e RUBIN, 1991).

Descreve-se que o processo de iniciação ainda nesse modelo ocorre de forma completa em aproximadamente 48 a 72 horas, enquanto a promoção se prolonga por cerca de 6 semanas. No caso de outros protocolos de hepatocarcinogênese, como por exemplo do modelo do "ácido orótico" ou do "fenobarbital" (WU e MORENO, 1998), a iniciação se dá durante o mesmo período de tempo, embora a promoção requeira cerca de 10 a 20 semanas (FARBER *et al.*, 1988).

É interessante notar que o fenótipo de resistência dos hepatócitos iniciados tem inúmeras semelhanças com o fenótipo de células de alguns cânceres de seres humanos, quando estes se tornam resistentes a agentes quimioterápicos, graças também a uma maior expressão do gene *mdr* (FARBER e RUBIN, 1991).

Assim, durante a expansão clonal dos hepatócitos iniciados na direção da formação de nódulos pode-se observar, logo de início, o aparecimento de pequenas ilhotas microscópicas denominadas de *focos* distribuídas aleatoriamente pelo fígado e sem relacionamento óbvio com qualquer zona do ácino ou lóbulo hepático. Em alguns modelos de hepatocarcinogênese estas expandem rapidamente através de proliferação celular, para gerar nódulos macroscópicos em alguns poucos dias (7 a 10 dias após aplicação do 2-AAF, no caso do modelo do RH). Em outros, a expansão é lenta, durando várias semanas (FARBER, 1984a, 1984b).

Estes focos são considerados "pré-neoplásicos", apesar de apenas alguns poucos (menos de 5%) evoluírem para nódulos persistentes de hepatócitos e um menor número ainda estar relacionado, finalmente, ao câncer. Isto se deve a uma outra propriedade inerente aos focos e nódulos de hepatócitos, ou seja à capacidade que estes apresentam de sofrerem um processo denominado de *remodelação*, ou seguirem, por sua vez, o caminho da *persistência* (TATEMATSU *et al.*, 1983; FARBER, 1984a; 1990; FARBER e RUBIN, 1991).

Não se sabe o motivo pelo qual focos e nódulos de hepatócitos adotam uma das duas opções, devendo estas corresponderem, entretanto, à expressão de alguma alteração incomum no genoma desencadeada por um carcinogênico durante o processo de iniciação (FARBER, 1984a; 1990; FARBER e RUBIN, 1991).

A remodelação está associada a alterações na bioquímica, arquitetura, organização e ultraestrutura dos focos e nódulos, de modo que estes se tornam muito semelhantes, senão idênticos, ao fígado maduro normal, desaparecendo portanto. Por outro lado, a persistência de alguns poucos nódulos parece indicar um bloqueio nesse processo, surgindo a opção para a verdadeira evolução da sequência carcinogênica do nódulo para o câncer (FARBER, 1984a; 1990; FARBER e RUBIN, 1991).

Esta longa sequência, ou seja, a etapa assim chamada de *progressão* da hepatocarcinogênese contém, na verdade, as fases que são mais relevantes e ainda muito pouco conhecidas para o estabelecimento da malignidade, caracterizando-se pelo desenvolvimento de uma instabilidade genética nas células com consequente formação de subpopulações celulares neoplásicas heterogêneas (SARGENT *et al.*, 1996).

Apesar de ainda praticamente desconhecida, tornou-se evidente no decorrer dos anos, entretanto, que a etapa de progressão pode ser modulada por exemplo através da alimentação ou por influências hormonais, que tendem a retardá-la ou inibi-la. Isto faz com que represente um segmento atrativo do processo carcinogênico visando-se a quimioprevenção do câncer (FARBER e SARMA, 1987).

Durante a progressão, graças ainda ao processo de remodelação que também continua, ocorre subsequente redução no número de nódulos persistentes de hepatócitos, de tal forma que se costuma observar apenas cerca de 1-3 desses nódulos em todo o fígado, quando se pode detectar concomitantemente um câncer de forma inequívoca, cerca de 10 a 12 meses após realização do processo de iniciação (FARBER e SARMA, 1987; FARBER *et al.*, 1988).

Descreve-se, ainda, que por ocasião da aplicação do modelo original do "hepatócito resistente" em ratos Fischer (F-344) machos, a breve exposição ao 2-AAF administrado na ração em concentrações variando de 0,015 a 0,05% é suficiente para promover o desenvolvimento de hepatocarcinomas em cerca de 70-90% dos animais iniciados com os carcinogênicos DEN, *N*-metil-nitrosouréia (MNU), benzo[*a*]pireno (BP) ou dimetilhidrazina (DMH) (FARBER, 1984c; IMAI *et al.*, 1997).

Apesar da administração crônica isolada do 2-AAF na ração poder iniciar hepatócitos e desencadear o desenvolvimento de cânceres no fígado, deve ser enfatizado que a simples e rápida exposição a essa substância nas condições em que é empregada no modelo do RH original e sem a prévia aplicação de carcinogênicos, não é capaz de induzir à formação de hepatócitos resistentes e nem de hepatocarcinomas (FARBER e CAMERON, 1980; SOLT *et al.*, 1983; SEMPLE-ROBERTS *et al.*, 1987).

Quando o 2-AAF foi aplicado em ratos F-344 por intubação gástrica nas concentrações totais de 60 a 80 mg/kg de peso corpóreo distribuídos em 3-4 doses após a administração da DEN, por ocasião da tentativa de desenvolvimento de um modelo do "hepatócito resistente" modificado que evitasse as restrições legais impostas à adição de carcinogênicos nas rações

em diversos países desenvolvidos, constatou-se, entretanto, incidências de cânceres que variaram de 50 a 71% (SEMPLE-ROBERTS *et al.*, 1987).

No presente estudo a incidência de câncer observada ao exame macroscópico do fígado por ocasião do sacrifício do grupo de ratos Wistar machos submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho por oito semanas consecutivas durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese (grupo **OM** — controles) correspondeu a 62,5% (Tabela 2). Além disso, constatou-se ainda em cinco dos oito animais desse grupo um total de 26 nódulos persistentes de hepatócitos, ou seja, em média cerca de 5 dessas lesões proliferativas persistentes por rato.

Tais resultados estão de acordo, portanto, com evidências anteriormente descritas na literatura por ocasião da aplicação do modelo do "hepatócito resistente" modificado em ratos F-344 (SEMPLE-ROBERTS *et al.*, 1987), embora no atual experimento a incidência de cânceres constatada no grupo **OM** (controles) tenha sido pouco menor do que a observada em investigações conduzidas também com ratos da linhagem Fischer (F-344) submetidos ao modelo do RH original e que utiliza, portanto, o 2-AAF adicionado à ração dos animais.

Esta diferença talvez possa ser atribuída à forma de administração do 2-AAF (por intubação gástrica), ou à maior resistência que ratos Wistar apresentam reconhecidamente por ocasião da aplicação desse protocolo de hepatocarcinogênese (IRVING, 1975; FARBER *et al.*, 1976), fato este que logo de início se procurou contornar quando da aplicação do modelo do RH modificado no presente estudo, mediante a utilização de 2-AAF em grande dosagem total (120 mg/kg de peso corpóreo distribuídos em 6 doses iguais). Vale destacar que ratos dessa linhagem exibem ainda, caracteristicamente, uma reduzida tendência para a formação espontânea de hepatocarcinomas (SCHULTE-HERMANN, 1985).

Da mesma forma que em recentes experimentos conduzidos em condições praticamente idênticas (SILVEIRA, 1998), ficou, entretanto, aqui também clara a necessidade desse protocolo de hepatocarcinogênese ser melhor adaptado a ratos Wistar, visando-se a subsequente obtenção de maiores incidências de cânceres ao menos no grupo controle, o que sem dúvida facilitaria a interpretação de resultados de estudos em que se procura avaliar comparativamente a atividade quimiopreventiva ou terapêutica de substâncias.

Tais modificações poderiam incluir, como sugerido, um aumento da concentração ou da frequência de administração do 2-AAF, ou até mesmo a realização do sacrifício dos animais após período mais prolongado do que aos doze meses da realização do processo de iniciação (SILVEIRA, 1998).

Quando ratos Wistar foram submetidos ao modelo do RH e tratados com β -caroteno (grupo **β C**) ou vitamina A (grupo **VA**) da 40ª à 48ª semana após aplicação do carcinogênico iniciante DEN, observou-se também no atual estudo à macroscopia do fígado quando do sacrifício dos animais, incidências de cânceres correspondendo a 25% nesses dois grupos experimentais (Tabela 2) e equivalendo, portanto, a incidências 60% menores do que a constatada no respectivo grupo controle (62,5%; grupo **OM**).

Além disso, ainda em comparação ao grupo controle, observou-se também nessa ocasião que o grupo de animais aos quais se administrou o carotenóide (grupo **β C**) apresentou incidência pouco maior de nódulos de hepatócitos e praticamente o mesmo número dessas lesões pré-neoplásicas persistentes, ao contrário do grupo de ratos tratados com o retinóide (grupo **VA**), em que se constatou menor incidência e número total de nódulos persistentes.

Estes dados indicam, portanto, que o β -caroteno e a vitamina A apresentam efeitos inibitórios no desenvolvimento de lesões neoplásicas malignas quando administrados por 8 semanas consecutivas especificamente durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese, e sugerem que esta atividade possa ocorrer, tanto no caso do carotenóide como do retinóide, por

ocasião da conversão de nódulos persistentes de hepatócitos em cânceres, enquanto apenas o retinóide é capaz de inibir a evolução dessas lesões pré-neoplásicas ou fazer com que regredam.

Entende-se por conversão uma das etapas da carcinogênese que ocorre logo após a progressão pré-maligna e cujo conceito surgiu, basicamente, a partir de dados experimentais obtidos principalmente em modelos de carcinogênese hepática ou de pele e que demonstraram que a formação de neoplasias malignas poderia ser em muito aumentada através do tratamento de lesões pré-neoplásicas com carcinogênicos de ação direta, ou seja, genotóxicos (POTTER, 1981; HENNINGS *et al.*, 1983; YUSPA, 1994; SARGENT *et al.*, 1996). Assim, da mesma forma que a iniciação, a conversão maligna também parece envolver, provavelmente, eventos responsáveis pela produção de alterações genéticas.

Acredita-se ainda que justamente a ocorrência de lesões pré-neoplásicas como precursoras de diversos cânceres em seres humanos, como por exemplo leucoplaquias orais em fumantes e focos hiperplásicos do colo uterino, dê suporte à existência da etapa de conversão também no homem (DRAGSTED *et al.*, 1993).

Apesar de praticamente não existirem referências na literatura a respeito de investigações em que também se procurou avaliar os eventuais efeitos inibitórios do β -caroteno quando administrado durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese, resultados semelhantes aos do presente estudo foram relatados anos atrás, embora utilizando-se modelo de carcinogênese gástrica induzida em ratos pela *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG) diluída na água dos animais. Constatou-se, nesse caso, que o β -caroteno adicionado às rações foi capaz de inibir a progressão de displasias gástricas no sentido da evolução para carcinomas iniciais e infiltrantes em 65% e 67%, respectivamente, apesar de aumentar concomitantemente a formação das mesmas (SANTAMARIA *et al.*, 1987).

Já mais recentemente, e também de acordo com os resultados do atual estudo, em experimentos conduzidos em camundongos SENCAR fêmeas submetidos a modelo de carcinogênese de pele que empregava como agente iniciante o 7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno (DMBA) e como promotor o acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA), observou-se que as administrações de ácido retinóico (a forma biologicamente mais ativa da vitamina A) em doses farmacológicas nas rações (30 μ g/g), bem como de β -caroteno (600 μ g/g), inibiram a conversão de papilomas em carcinomas, aumentando entretanto a formação dessas lesões pré-neoplásicas benignas no caso do carotenóide, mas reduzindo seus números no caso do retinóide (CHEN *et al.*, 1993; DE LUCA *et al.*, 1993; 1994).

Todavia, constatou-se também posteriormente em um outro estudo conduzido em camundongos fêmeas embora da linhagem CD-1, que a administração oral de β -caroteno (200 mg/kg de peso corpóreo/dia) por intubação gástrica durante catorze dias consecutivos foi capaz de reduzir o tamanho cumulativo de papilomas induzidos na pele através da aplicação de DMBA (KATSUMURA *et al.*, 1996).

Apesar de não se ter aventado na ocasião qualquer mecanismo específico que pudesse explicar a maior formação de papilomas após administração de β -caroteno em excesso na ração, a não ser a maior necessidade que essas lesões pré-neoplásicas eventualmente teriam de vitamina A, e que talvez esses papilomas correspondessem justamente a lesões pré-neoplásicas que não iriam sofrer, na verdade, conversão em carcinomas, sugeriu-se nesse caso que o carotenóide poderia estar atuando nesse processo graças à sua capacidade de transformação no organismo em ácido retinóico (CHEN *et al.*, 1993).

Uma hipótese provável para explicar a ação do ácido retinóico na eficiência de conversão envolveria, por sua vez, a ativação da expressão de receptores intranucleares para retinóides e consequente formação de complexos protéicos com proteínas de proto-oncogenes tais como *c-fos*,

interferindo desse modo com suas ligações ao sítio do fator de transcrição AP-1 e prevenindo suas ações na conversão para a malignidade (DE LUCA *et al.*, 1993; 1994).

Por outro lado, o ácido retinóico poderia também induzir a diferenciação ou apoptose das células dos papilomas e/ou carcinomas, reduzindo a possibilidade de formação de lesões malignas visíveis (DE LUCA *et al.*, 1994).

De qualquer modo, é provável que na verdade inúmeros mecanismos estejam envolvidos com a etapa de conversão da carcinogênese (YUSPA, 1994), podendo, portanto, serem influenciados tanto por tratamentos com o β -caroteno como com a vitamina A.

Descreve-se que alguns destes mecanismos incluiriam não só os aumentos nas taxas de proliferação celular e de eventos mutacionais em genes como o *c-Ha-ras* e o *p53* já observáveis, inclusive, durante a fase de progressão pré-maligna, como também alterações na expressão de genes do tipo *c-fos*, para proteases secretadas e para receptores presentes na superfície celular, incluindo integrinas (YUSPA, 1994).

Assim, poderiam ter aqui um papel de destaque as reconhecidas propriedades antimutagênicas do β -caroteno (KRINSKY, 1993; AIDOO *et al.*, 1995; RENNER, 1995) que se relata serem capazes, inclusive, de prevenir o surgimento de alterações cromossômicas (WEITBERG *et al.*, 1985; STICH e DUNN, 1986; MUKHERJEE *et al.*, 1991; SALVADORI *et al.*, 1992; SARKAR *et al.*, 1997).

Para melhor esclarecer os resultados do presente estudo e determinar mecanismos que pudessem estar a eles relacionados, seria talvez interessante que se procurasse avaliar no futuro, a existência de eventuais efeitos inibitórios do β -caroteno ou da vitamina A especificamente durante a fase de conversão da hepatocarcinogênese, utilizando-se, para tanto, protocolo que consistisse em três etapas distintas e incluísse a aplicação adicional de um agente progressor como a etilnitrosouréia, hidroxauréia ou benzeno, capaz de produzir alterações no genoma.

Tais protocolos já foram descritos para a indução da carcinogênese de pele em camundongos (HENNINGS *et al.*, 1983) ou até mesmo da hepatocarcinogênese em ratos (DRAGAN *et al.*, 1993), embora se acredite que no caso o próprio modelo do RH pudesse também ser adaptado nesse sentido.

Além dessas investigações já citadas, é relativamente pequeno o número de estudos relatados na literatura em que se procurou também avaliar os eventuais efeitos inibitórios do β -caroteno quando administrado durante a fase de progressão da carcinogênese.

Assim, descreveu-se em um outro experimento que também utilizou modelo de carcinogênese de pele, que o carotenóide não foi capaz de inibir a conversão de papilomas em carcinomas, quando administrado nas rações de camundongos Skh na concentração de 30 mg/g (STEINEL e BAKER, 1990).

Da mesma forma, os resultados de uma investigação clínica demonstraram que a suplementação com β -caroteno durante 5 anos não foi capaz de prevenir a ocorrência de novos carcinomas de células basais ou de células escamosas, em pacientes previamente portadores de cânceres de pele que não do tipo melanoma (GREENBERG *et al.*, 1990).

Por outro lado, ainda de acordo com os dados do presente estudo, observou-se uma diminuição no número de animais com carcinomas de pele após administração por 24 semanas consecutivas durante a fase de progressão, de β -caroteno na ração (1 mg/g) de camundongos submetidos a um modelo experimental em que a exposição dos animais a uma única dose de radiação UV-B era suficiente para iniciar a carcinogênese (MATHEWS-ROTH e KRINSKY, 1987).

Além disso, descreveu-se também que o β -caroteno quando injetado localmente em sítios neoplásicos induzidos pelo carcinogênico DMBA foi capaz de causar a regressão de carcinomas em

bolsas faciais de "hamsters" (SCHWARTZ e SHKLAR, 1988; SCHWARTZ *et al.*, 1991), da mesma forma que sua administração oral em combinação com o alfa-tocoferol (SHKLAR *et al.*, 1989).

Em um estudo em que as rações de camundongos SHN fêmeas susceptíveis ao desenvolvimento espontâneo de neoplasias malignas mamárias foram suplementadas com algas contendo elevadas concentrações de β -caroteno (*Dunaliella bardawil*), não se observou proteção no grupo de animais tratado do 1º ao 4º mês durante a etapa de iniciação da carcinogênese; entretanto, constatou-se efeitos inibitórios significantes no grupo tratado do 4º ao 7º mês, ou seja, no decorrer tanto do processo de iniciação como de promoção, os quais foram ainda mais intensos no grupo tratado do 7º ao 10º mês durante a fase de progressão (NAGASAWA *et al.*, 1991).

Assim, evidências nesse sentido publicadas até 1992 possibilitaram que se sugerisse em uma revisão, que o β -caroteno teria uma ação protetora mais pronunciada se administrado no decorrer da etapa de progressão da carcinogênese (ROUSSEAU *et al.*, 1992).

Os resultados de uma investigação recente em que se constatou um menor número de carcinomas ductais *in situ* e invasivos após administração de β -caroteno na ração (25 ppm) especificamente durante a fase de progressão da carcinogênese pancreática induzida em "hamsters" pela aplicação de *N*-nitrosobis(2-oxopropil)amina, estão também de acordo, portanto, com essa sugestão e de certa forma com os dados do presente estudo (MAJIMA *et al.*, 1998).

Considera-se, por outro lado, que retinóides teriam uma ação predominantemente quimiopreventiva contra o câncer mas não quimioterapêutica, pois se observou que têm a capacidade de inibir principalmente a etapa de promoção da carcinogênese em diversos modelos experimentais e não suas etapas mais tardias, ou seja, a conversão e progressão (MUTO *et al.*, 1996).

Em se tratando da vitamina A, alguns poucos estudos tiveram também a oportunidade, entretanto, de constatar efeitos inibitórios quando de sua administração durante a etapa de progressão, especialmente em modelos de carcinogênese de mama e pâncreas em ratos, de pele em camundongos, bem como da bolsa facial em "hamsters" (MOON *et al.*, 1994).

Da mesma forma, observou-se ainda em pacientes portadores de lesões cutâneas pré-malignas que o tratamento com retinol (25.000 UI/dia) resultou em uma redução significativa na incidência de carcinomas de células escamosas, em comparação ao grupo controle (MOON *et al.*, 1994).

Além disso, em um ensaio conduzido em 307 pacientes após ressecção de um câncer de pulmão de células não-pequenas em estadiamento grau I e que foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos, constatou-se o desenvolvimento de novas neoplasias malignas primárias pulmonares em 29 indivíduos do grupo controle, enquanto isto ocorreu em apenas 18 daqueles tratados por um ano com palmitato de retinila (300.000 UI/dia) (PASTORINO *et al.*, 1993).

Portanto, os resultados do presente estudo em que se constatou menor incidência de cânceres, bem como de nódulos persistentes de hepatócitos, em animais submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com vitamina A por oito semanas consecutivas durante a etapa de progressão da hepatocarcinogênese, estão de acordo com essas poucas evidências nesse sentido já descritas na literatura e confirmam, além disso, dados de outro estudo recentemente desenvolvido em nosso meio e realizado praticamente nas mesmas condições experimentais (SILVEIRA, 1998).

6.2 Sobre a quantificação à microscopia das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas positivas para a γ GT presentes nos fígados de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Os focos e nódulos de hepatócitos induzidos no fígado de ratos expostos aos diferentes modelos de hepatocarcinogênese apresentam caracteristicamente diversas alterações funcionais, o que possibilita que sejam facilmente evidenciados através da utilização de métodos histoquímicos e quantificados em sistemas computadorizados de análise de imagem. Nesse sentido, considera-se a reação de coloração positiva para a enzima gama-glutamyltranspeptidase (γ GT) como um dos métodos mais úteis, sendo, portanto, amplamente utilizado até hoje em dia, pois cerca de 90-95% dos focos e nódulos são positivos para tal marcador histoquímico em todas as etapas das fases pré-neoplásica e neoplásica da hepatocarcinogênese (FARBER, 1980; HANIGAN e PITOT, 1985).

A descoberta de uma associação entre a γ GT e a carcinogênese hepática ocorreu pela primeira vez em 1972, quando se constatou concentrações elevadas dessa enzima nos fígados de ratos expostos ao carcinogênico 3'-metil-4-dimetilaminoazobenzeno, bem como em hepatocarcinomas transplantáveis induzidos quimicamente em ratos (FIALA *et al.*, 1972).

Posteriormente, utilizando-se um corante histoquímico para a γ GT concluiu-se que as concentrações elevadas da enzima observadas durante a ingestão de carcinogênicos eram devidas a aumentos de atividade de γ GT em focos de hepatócitos (KALENGAYI *et al.*, 1975).

Investigações subsequentes tiveram então a oportunidade de demonstrar a importância do aumento da atividade da enzima γ GT como marcador de lesões pré-neoplásicas nos fígados de ratos expostos a uma ampla variedade de carcinogênicos com estruturas químicas bastante diversas, incluindo a DEN, 2-AAF, N-nitrosomorfolina e aflatoxina B1, bem como em neoplasias hepáticas de camundongos expostos ao safrol ou ao o-aminoazotolueno e em carcinomas hepatocelulares de seres humanos (HANIGAN e PITOT, 1985; YOUNGMAN e CAMPBELL, 1992; STARK *et al.*, 1994).

A enzima γ GT tem ampla distribuição tanto em tecidos vegetais como animais, constituindo uma glicoproteína com duas subunidades e que se liga à membrana plasmática das células com seu sítio ativo voltado para o exterior (HORIUCHI *et al.*, 1978; HANIGAN e PITOT, 1985).

Em tecidos normais a atividade enzimática pode ser constatada principalmente em células que apresentam função secretória ou absorptiva, sendo a γ GT observada em maiores concentrações nos rins e, em seguida, no pâncreas e vesículas seminais. Todos os outros tecidos apresentam menos de 1% da atividade constatada no rim, estando esta também presente no epitélio de ductos biliares e nas regiões das membranas dos hepatócitos voltadas para o canalículo biliar (HANIGAN e PITOT, 1985; IWAI *et al.*, 1994).

Concentrações anormalmente elevadas de γ GT são frequentemente observadas, além disso, em neoplasias de uma variedade de tecidos tais como carcinomas hepatocelulares e da pele, adenocarcinomas de pulmão e em alguns cânceres de mama (HANIGAN e PITOT, 1985).

Descreve-se que a função fisiológica da γ GT está intensamente associada ao metabolismo e transporte da glutatona (L- γ -glutamyl-L-cisteinil-glicina), seu principal substrato, sendo a única protease conhecida capaz de clivar esse tripeptídeo intacto e de utilizar, além disso, uma ampla variedade de compostos gama-glutamyl como substratos, facilitando a transferência de seus grupamentos gama-glutamyl para numerosos peptídeos e aminoácidos aceptores (MEISTER, 1994).

A glutathione está presente, por sua vez, em elevadas concentrações praticamente em todas as células de mamíferos onde representa cerca de 90% dos tióis não-proteicos e ciclando entre uma forma tiol reduzida (GSH) e uma oxidada (GSSG), em que dois tripeptídeos se encontram ligados por uma ponte de dissulfeto.

Esta constitui, provavelmente, o antioxidante intracelular mais importante, tendo a capacidade de reagir com o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos e desempenhando um papel essencial na destoxificação de xenobióticos e carcinogênicos, bem como na proliferação celular (HENDRICH e PITOT, 1987).

Em 1973 foi proposta a existência de um ciclo "gama-glutamil" que seria responsável pelo transporte de aminoácidos e no qual a γ GT desempenharia um papel fundamental transferindo o resíduo gama-glutamil da glutathione a um aminoácido aceptor e transportando o dipeptídeo gama-glutamil resultante através das membranas celulares (MEISTER, 1973).

Posteriormente questionou-se, entretanto, a validade dessa hipótese, sugerindo-se que pelo fato da glutathione não poder ser captada diretamente a partir do soro ou da urina pelas células em geral, o papel fisiológico significativo da γ GT seria, na verdade, o de realizar a hidrólise da glutathione em seus aminoácidos constituintes que seriam então absorvidos (CURTHOYS e HUGHEY, 1979).

Mais especificamente no caso do hepatócito, a γ GT presente em sua superfície poderia hidrolisar o grupamento gama-glutamil da glutathione existente no soro, fornecendo, dessa forma, os aminoácidos necessários à síntese intracelular de glutathione (HANIGAN e PITOT, 1985; ABBOTT e MEISTER, 1986).

Para uma célula proliferar são necessárias concentrações adequadas de glutathione. Portanto, a indução da γ GT nos hepatócitos alterados durante a hepatocarcinogênese poderia possibilitar que estes utilizassem mais facilmente a glutathione extracelular, melhor preservando, dessa forma, suas próprias concentrações internas do tripeptídeo (HANIGAN e PITOT, 1985; HENDRICH e PITOT, 1987).

Assim, hepatócitos com concentrações elevadas de γ GT teriam uma vantagem sobre os hepatócitos γ GT-negativos, por ocasião da administração de compostos carcinogênicos ou promotores, que costumam depletar as concentrações intracelulares de glutathione. Isto implicaria que a γ GT não seria apenas um marcador fenotípico de células pré-neoplásicas, mas sim uma enzima que proporcionaria uma vantagem seletiva à célula por ocasião do estresse imposto pelos protocolos de hepatocarcinogênese (HANIGAN e PITOT, 1985; HENDRICH e PITOT, 1987).

Em conformidade com essa hipótese demonstrou-se, já mais recentemente, que a elevação da atividade da γ GT em nódulos de hepatócitos estava efetivamente correlacionada com a maior capacidade dessas estruturas removerem glutathione da circulação, sugerindo-se que esses fatores poderiam ser críticos para a maior resistência das lesões pré-neoplásicas observada em modelos de hepatocarcinogênese (CAMERON *et al.*, 1991).

De qualquer forma, a presença e o número de focos positivos para a γ GT é geralmente considerada como um índice para hepatócitos alterados induzidos por carcinogênicos químicos durante o processo de iniciação da carcinogênese, tendo-se demonstrado que suas frequências dependem tanto da dose do carcinogênico iniciante como da duração com que este foi aplicado (EMMELOT e SCHERER, 1980).

Existem, entretanto, grandes discrepâncias entre o número de focos de hepatócitos que surgem logo de início no processo da carcinogênese e a recuperação final de neoplasias malignas, provavelmente devido ao processo de remodelação, bem como à instabilidade fenotípica dos mesmos.

De acordo com seu aspecto à marcação com a γ GT, descreve-se que as lesões pré-neoplásicas podem ser classificadas em dois tipos, ou seja, em persistentes e em remodelação (ENOMOTO e FARBER, 1982; PASCALE *et al.*, 1992).

Demonstrou-se que lesões do tipo persistente, marcadas uniformemente, foram vistas já às quatro semanas durante desenvolvimento do modelo do RH, sendo que às 6 semanas cerca de 75% das lesões encontravam-se em remodelação, mostrando irregularidade de contornos e perda da uniformidade na coloração. Esta perda era acompanhada por remodelação arquitetural para um fígado de aspecto normal (ENOMOTO e FARBER, 1982).

Além disso, em uma investigação conduzida em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH em que se procurou avaliar a cinética de evolução dos focos e nódulos de hepatócitos positivos para a γ GT, observou-se que entre 4 a 9 semanas após a iniciação estes adentraram em uma fase de rápido crescimento, com subsequente diminuição progressiva de seus números e áreas, até que fossem observados apenas alguns poucos e em remodelação, por ocasião do sacrifício na 26ª semana (GARCEA *et al.*, 1989a).

Constatou-se no presente estudo por ocasião da quantificação das lesões pré-neoplásicas positivas para a γ GT, que ratos da linhagem Wistar submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) por oito semanas consecutivas durante a etapa de progressão da hepatocarcinogênese, apresentaram em seus fígados praticamente o mesmo número médio de focos/nódulos de hepatócitos quando de seus respectivos sacrifícios na 48ª semana após aplicação do carcinogênico iniciante DEN (Tabela 3).

Observou-se, ainda, que as áreas médias dessas lesões pré-neoplásicas, bem como as porcentagens de área do corte ocupadas pelas mesmas, também não diferiram entre si do ponto de vista estatístico, embora se constatasse certa tendência tanto por parte do tratamento com o carotenóide (grupo β C) como com o retinóide (grupo VA) em reduzi-las.

Assim, observa-se que nesses três grupos experimentais os números médios de focos/nódulos de hepatócitos positivos para a γ GT por cm^2 (Tabela 3) foram menores do que aqueles constatados em uma investigação anterior conduzida sob condições experimentais de certa forma semelhantes e também em grupos de ratos Wistar, embora nesse último caso estes tivessem sido tratados por 8 semanas consecutivas com óleo de milho (n° focos/ $\text{cm}^2 = 37,1 \pm 9,7$), β -caroteno (n° focos/ $\text{cm}^2 = 20,1 \pm 12,5$) ou vitamina A (n° focos/ $\text{cm}^2 = 34,8 \pm 9,6$), respectivamente, durante as fases de iniciação e seleção/promoção do modelo do RH e sacrificados 6 semanas após administração da DEN (MORENO *et al.*, 1995a).

Estes resultados do presente estudo estão, portanto, de acordo com evidências relatadas anteriormente na literatura e que demonstram a ocorrência durante a evolução da hepatocarcinogênese para etapas mais tardias, de uma diminuição do número de focos/nódulos de hepatócitos positivos para a γ GT a partir de nove semanas da iniciação, graças em grande parte ao processo de remodelação (GARCEA *et al.*, 1989a).

É questionável, entretanto, o verdadeiro papel que teriam no contexto geral da hepatocarcinogênese estas poucas lesões pré-neoplásicas γ GT positivas observáveis à microscopia, remanescentes após um ano da aplicação da DEN e ainda observáveis em plena fase de progressão.

Talvez se trate daquelas lesões focais que desde o início seriam benignas e assim continuariam, demonstrando proliferação espontânea de hepatócitos mas sem outras evidências de evolução para neoplasias, incluindo o câncer (e que portanto se desenvolveriam de acordo com a assim denominada sequência A de evolução) (FARBER *et al.*, 1988), da mesma forma que o relatado para papilomas que *a priori* não seriam passíveis de sofrerem conversão e

progredirem para a malignidade, observados em modelo de carcinogênese de pele induzida em camundongos (SHUBIK, 1950; HENNINGS *et al.*, 1985).

Por outro lado, pode ser que estas ainda possam vir a evoluir com o decorrer do tempo, pois apresentam condições intrínsecas para tanto. Assim, observou-se que o catabolismo da glutatona pela γ GT na presença de metais de transição pode iniciar por si só um processo oxidativo nos focos e nódulos pré-neoplásicos de hepatócitos, com subsequente produção de um ambiente rico em radicais livres e consequentes lesões oxidativas. Isto fez, portanto, com que se sugerisse que esses danos estimulados pela maior atividade da enzima γ GT presente nos focos e nódulos de hepatócitos, poderiam vir a contribuir para com os processos através dos quais as células no interior dessas lesões progrediriam para a malignidade (HANIGAN e PITOT, 1985; STARK *et al.*, 1994).

6.3 Sobre os aspectos morfológicos e a quantificação das lesões hepáticas por ocasião da realização do exame histopatológico dos fígados de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Cortes histológicos corados através do método rotineiro de hematoxilina-eosina possibilitam que se realize no fígado de ratos submetidos a modelos de hepatocarcinogênese, uma melhor caracterização morfológica dos tipos de hepatócitos alterados presentes em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, bem como a verificação da existência ou não de outras alterações no interior ou exterior das mesmas.

Embora não se tenha feito uma determinação acurada de suas respectivas porcentagens, constatou-se no presente estudo por ocasião da realização da análise histopatológica do fígado de ratos Wistar submetidos ao modelo do RH e tratados por oito semanas consecutivas com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese, que a maioria das lesões pré-neoplásicas correspondeu nos três grupos experimentais principalmente a focos e nódulos de hepatócitos assim denominados de células claras e mistos, embora pudessem ser também observados em menor quantidade os outros tipos de focos e nódulos, ou seja, os constituídos predominantemente por células acidófilas ou basófilas.

Acredita-se que os vários tipos histológicos de focos e nódulos reflitam variações no metabolismo do glicogênio e na taxa de crescimento, exibindo os basofílicos o menor acúmulo desse carboidrato e a maior síntese de DNA em relação às outras lesões pré-neoplásicas, e estando estes, talvez, mais propensos à transformação cancerosa (ZERBAN *et al.*, 1994).

Por outro lado, os focos constituídos predominantemente de células claras, que se apresentam com volume aumentado e com seu citoplasma rarefeito corando-se com pouca intensidade pela eosina e nas quais há acúmulo de glicogênio, são considerados os primeiros a surgirem na hepatocarcinogênese induzida por vários modelos, sendo também os que apresentariam características morfológicas menos agressivas. Já as lesões acidofílicas, mais agressivas e com células cujo citoplasma se cora mais intensamente pela eosina o que lhes confere uma coloração avermelhada uniforme, representariam uma etapa evolutiva na direção da malignidade. (MOORE *et al.*, 1982; BANNASCH, 1984; BANNASCH e ZERBAN, 1990).

Tipos intermediários de lesões pré-neoplásicas foram também identificados e contendo células claras e acidofílicas, podendo, portanto, serem designados como "focos/nódulos claro-eosinofílicos" (KRAUPP-GRASL *et al.*, 1990). Considerou-se entretanto mais recentemente como mais apropriado

para os mesmos o termo "focos mistos", por se acreditar que se tratem, na verdade, de uma espécie de transição de uma lesão pré-neoplásica para outra (DAGLI, 1994).

Desta forma, a análise das características citológicas dos focos e nódulos de hepatócitos presentes no fígado dos animais dos três grupos experimentais (grupo OM — controles; β C e VA) sacrificados 12 meses após realização do processo de iniciação indicou, no presente estudo, a existência de uma predominância de lesões pré-neoplásicas consideradas menos agressivas, quais sejam as dos tipos histológicos constituídos principalmente por células claras e mistos. Esta revelou, ainda, que aparentemente o padrão de distribuição das mesmas não variou entre os três grupos experimentais, o que também sugere que tanto o tratamento com β -caroteno como com vitamina A por oito semanas consecutivas na fase de progressão da hepatocarcinogênese, não tiveram influências dignas de nota nesse sentido e, portanto, nas reações metabólicas que poderiam determinar as características histológicas dessas diversas lesões pré-neoplásicas (ZERBAN *et al.*, 1994).

Estes resultados estão de acordo com os dados de uma investigação recente também conduzida em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH e em condições experimentais bastante semelhantes, em que se observou 12 meses após aplicação do carcinogênico iniciante DEN, a presença em maior porcentagem de focos e nódulos mistos de hepatócitos no fígado de animais tratados com óleo de milho ou vitamina A por oito semanas consecutivas durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese (SILVEIRA, 1998).

Estão ainda de acordo com as evidências de um outro estudo em que ratos dessa linhagem foram submetidos ao mesmo modelo de hepatocarcinogênese acrescido de promoção com fenobarbital por 16 semanas consecutivas, embora sacrificados 14 meses após realização do processo de iniciação. Constatou-se também nesse caso, a presença em maior porcentagem de focos e nódulos de hepatócitos morfológicamente menos agressivos, constituídos principalmente por células claras e acidofílicas, ao invés dos mais agressivos com predominância de células basofílicas (PASCALE *et al.*, 1992).

Ainda nessa investigação observou-se, entretanto, que o tratamento dos animais com S-adenosil-L-metionina (SAM), um composto lipotrópico doador de grupamentos metila, apesar de também não modificar os padrões histológicos dos nódulos de hepatócitos reduziu, no decorrer do tempo, a porcentagem dos basofílicos, bem como a incidência de hepatocarcinomas (PASCALE *et al.*, 1992).

Seria interessante, portanto, que por ocasião da realização de experimentos futuros se procurasse avaliar de forma mais detalhada no decorrer da hepatocarcinogênese, uma eventual ação inibitória tanto por parte do β -caroteno como da vitamina A mais especificamente em relação aos focos/nódulos basofílicos, os quais são amplamente reconhecidos na literatura como representantes de uma pré-etape imediata no desenvolvimento dos carcinomas hepatocelulares (BANNASCH e ZERBAN, 1990).

No presente estudo, o exame histopatológico detalhado do fígado dos animais submetidos ao modelo do RH também revelou a existência de lesões hepáticas do tipo colangiofibrose, peliose e espongirose, que ocorreram com maior ou menor incidência nos três grupos experimentais (**Quadro 1**), e as quais se questiona, todavia, se seriam ou não pré-neoplásicas (BANNASCH e ZERBAN, 1990).

Além disso, este evidenciou a presença do colangioma cístico, alteração agora considerada neoplásica e frequentemente observável no fígado de ratos tratados com doses elevadas de hepatocarcinogênicos, mas para a qual não existem evidências de que possa eventualmente vir a progredir para o carcinoma colangiocelular (BANNASCH e ZERBAN, 1990). De qualquer forma, observou-se nesse caso em comparação ao grupo controle (grupo OM), a mesma incidência deste tipo de neoplasia hepática benigna no grupo de animais tratados com

β -caroteno (grupo β C) durante a fase de progressão do modelo do RH, enquanto esta foi entretanto menor no grupo de ratos aos quais se administrou a vitamina A (**Quadro 1**).

Em se tratando do adenoma hepatocelular (nódulo persistente de hepatócito), também considerado uma neoplasia benigna mas para a qual a maioria dos estudos aponta para a existência de uma relação direta do tipo precursor-produto entre a mesma e o surgimento da neoplasia maligna hepática (FARBER, 1984a; BANNASCH e ZERBAN, 1990), a análise histopatológica demonstrou, por sua vez, ainda em comparação ao grupo controle (grupo OM), uma incidência pouco menor no fígado do grupo de animais submetidos ao modelo do RH e nos quais se aplicou o carotenóide (grupo β C), enquanto se constatou pronunciada redução da mesma no grupo de ratos tratados com o retinóide (grupo VA) (**Quadro 1**).

Esta análise também revelou menores incidências de carcinomas hepatocelulares quando em comparação ao grupo controle (grupo OM), tanto no grupo de animais tratados com o β -caroteno (grupo β C) como com a vitamina A (grupo VA), e que apresentavam, basicamente, padrões bem diferenciados que foram considerados, no caso, como sendo dos tipos trabecular e glandular (**Quadro 1**).

Nesse sentido, descreve-se que em nível histológico podem ser distinguidas três variedades básicas de hepatocarcinomas, quais sejam, a do padrão trabecular, glandular (adenóide) e do sólido. Enquanto as duas primeiras cursam usualmente com um elevado grau de diferenciação e com um melhor prognóstico tanto em animais quanto no ser humano, relata-se que as lesões sólidas são predominantemente pouco diferenciadas e evoluem menos favoravelmente (BANNASCH e ZERBAN, 1990; ZERBAN *et al.*, 1994).

De uma forma geral, pode-se, portanto constatar que a análise histopatológica confirmou os resultados já anteriormente observados no presente estudo por ocasião da realização do exame macroscópico do fígado dos animais (**Tabela 2**), indicando também a ocorrência de efeitos inibitórios tanto por parte do β -caroteno como da vitamina A no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas malignas, quando administrados por oito semanas consecutivas especificamente durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

6.4 Sobre as concentrações hepáticas de β -caroteno e retinol de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Foram constatadas no presente estudo, concentrações mensuráveis de β -caroteno no fígado dos animais submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" (RH) e tratados com o carotenóide por oito semanas consecutivas durante a fase de progressão (grupo β C), ao contrário do que ocorreu nos grupos de ratos também submetidos a esse protocolo de hepatocarcinogênese e aos quais se administrou óleo de milho (grupo OM — controles) ou vitamina A (grupo VA), em que estas não foram detectáveis (**Tabela 4**). Isto era de certo modo esperável pois durante esse mesmo período, estes dois últimos grupos experimentais puderam apenas contar com suas rações como única fonte de β -caroteno.

Estes dados estão de acordo, portanto, com resultados de investigações anteriores que demonstraram a ocorrência de um acúmulo quantificável de β -caroteno intacto no fígado e outros órgãos de diversas espécies, incluindo o ser humano, ratos, galináceos, "ferrets", camundongos e cobaias (BONDI e SKLAN, 1984; SHAPIRO *et al.*, 1984; MAYNE e PARKER,

1986; KRINSKY *et al.*, 1990; MORENO *et al.*, 1991; OKOH *et al.*, 1993; SARKAR *et al.*, 1994; MORENO *et al.*, 1995; TEE *et al.*, 1996; RIZZI *et al.*, 1997; OLIVEIRA, 1998).

Por ocasião do sacrifício na 48ª semana os ratos do grupo β C tenderam ainda a apresentar concentrações hepáticas de retinol mais elevadas do que os animais do grupo controle (grupo OM), embora no caso as diferenças não tenham alcançado significância do ponto de vista estatístico (Tabela 4).

Resultados semelhantes foram também constatados em camundongos submetidos a modelo de carcinogênese de pele induzida pelo DMBA e tratados durante catorze dias consecutivos com β -caroteno (200 mg/kg de peso corpóreo/dia) durante a fase de progressão (KATSUMURA *et al.*, 1996), e sugerem que a quantidade do carotenóide que foi convertida em retinóides não foi suficiente para aumentar os níveis teciduais dos mesmos.

Em contrapartida, animais submetidos ao modelo do RH e tratados por oito semanas consecutivas com vitamina A (grupo VA) durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese, apresentaram concentrações hepáticas de retinol significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os ratos dos grupos controle (grupo OM) e β C (Tabela 4).

Assim, aumentos nas concentrações hepáticas de β -caroteno, e não de retinol, podem ser associados, no presente estudo, aos efeitos inibitórios no desenvolvimento de neoplasias constatados nos fígados de ratos submetidos ao modelo do RH e tratados por oito semanas consecutivas com o carotenóide na etapa de progressão da hepatocarcinogênese (grupo β C).

Por outro lado, no grupo de animais tratados com vitamina A durante essa mesma fase da carcinogênese hepática (grupo VA), alterações nas concentrações hepáticas de retinol, e não de β -caroteno, podem ser também associadas a atividades inibitórias no desenvolvimento de lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas malignas.

Portanto, estes resultados se constituem, conjuntamente, em fortes indícios da existência *in vivo* de uma atividade intrínseca do β -caroteno agora durante a etapa de progressão da hepatocarcinogênese, e confirmam evidências anteriores nesse sentido descritas na literatura e constatadas não só em camundongos tratados com o carotenóide durante a fase de progressão da carcinogênese de pele induzida pelo DMBA (KATSUMURA *et al.*, 1996), como também em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH, embora nesse caso os animais tenham sido tratados com β -caroteno em etapas mais iniciais da hepatocarcinogênese (MORENO *et al.*, 1995a; RIZZI *et al.*, 1997).

Baseado nas concentrações de retinol (vitamina A) constatadas no fígado dos animais dos grupos β C e VA, bem como nas respectivas doses de β -caroteno (7 mg/100 g de peso corpóreo) ou de vitamina A (1 mg/100 g de peso corpóreo) que estes receberam em dias alternados e por intubação gástrica, calculou-se que a razão de conversão do carotenóide em vitamina A correspondeu, no presente estudo, a um valor aproximado de 34:1.

Isto está de acordo com observações descritas anteriormente na literatura e que demonstraram em diversas espécies de animais, incluindo ratos e galináceos, que a conversão do β -caroteno em vitamina A diminui inversamente com a ingestão do carotenóide, à medida que suas dosagens forem se tornando cada vez maiores em relação aos requerimentos diários (BEESON, 1965; BAUERNFEIND, 1972; BRUBACHER e WEISER, 1985).

Está ainda de acordo com os resultados de uma investigação anterior também conduzida em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH e tratados por oito semanas consecutivas com β -caroteno e vitamina A nas mesmas dosagens que as utilizadas no presente estudo, embora esses tratamentos tenham sido realizados, no caso, em ratos mais jovens e durante as fases iniciais da hepatocarcinogênese, tendo-se constatado uma razão de conversão bem menor e correspondendo a 14:1 (MORENO *et al.*, 1995a).

Não se tem até o momento uma explicação convincente que pudesse esclarecer essas diferenças observadas em relação às razões de conversão constatadas nesses dois estudos.

Descreve-se, entretanto, que o grau de conversão do β -caroteno em vitamina A não é constante, sendo regulado por mecanismos homeostáticos envolvidos, por exemplo, com o controle da saturação dos depósitos de retinol do organismo bem como com a taxa de absorção do carotenóide em nível intestinal e sua posterior clivagem em vitamina A, um processo que ocorre não só na mucosa intestinal da maioria dos mamíferos como também no fígado e em diversos outros órgãos (BEESON, 1965; GERSTER, 1991; SILVEIRA e MORENO, 1998).

Assim, talvez esses mecanismos homeostáticos apesar de se manterem vigentes e provavelmente atuantes no sentido de proteger o organismo contra a ocorrência de uma eventual hipervitaminose A (GERSTER, 1991), venham ainda sofrer alterações com o decorrer do tempo, o que poderia explicar não só o aumento não significativo das concentrações hepáticas de retinol observado após a administração de β -caroteno (grupo β C) como também sua maior razão de conversão constatada na presente investigação, desde que nesta se deu início às aplicações do carotenóide quando os ratos já eram bem mais idosos que na investigação anterior.

Além disso, ainda nesse sentido, não se pode também excluir um papel da própria carcinogênese hepática que se encontrava no atual estudo em uma etapa já bem mais avançada, como eventual processo que pudesse ter interferido por tempo mais prolongado, e agora de forma mais intensa, com os mecanismos responsáveis pelo controle do grau de conversão do β -caroteno em vitamina A.

6.5 Sobre a proliferação celular no fígado e lesões neoplásicas hepáticas de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Estima-se que no fígado do rato adulto o período de vida das células parenquimatosas compreenda cerca de 200-400 dias (ROTSTEIN *et al.*, 1986). Assim, este consiste, normalmente, em um órgão quiescente que exibe atividade replicativa mínima.

De fato, mitoses são constatadas, nesse caso, em aproximadamente 1 em cada 20.000 hepatócitos, embora taxas mais elevadas de proliferação celular sejam observadas durante o crescimento e desenvolvimento do fígado (STEER, 1995).

Dois tipos de estímulo proliferativo foram identificados nesse órgão: a hiperplasia celular compensatória (regenerativa) e a direta, ou mitógeno-induzida. Na primeira, a síntese de DNA é precedida por uma perda de células como a que ocorre, por exemplo, após ressecção cirúrgica parcial, injúria química, vascular, nutricional ou por hepatite viral, enquanto na hiperplasia direta a síntese de DNA é estimulada sem perda celular, por substâncias mitogênicas tais como o nitrato de chumbo, proliferadores de peroxissomos, fenobarbital e acetato de ciproterona (COLUMBANO e SHINOZUKA, 1996). Neste último caso, assim que o estímulo mitogênico é suspenso, a massa e o conteúdo de DNA hepáticos regridem caracteristicamente, graças à apoptose (COLUMBANO, 1995).

A proliferação de hepatócitos induzida por alguns mitógenos primários é mediada por padrões de modulação de fatores de crescimento e transdução do sinal, diferentes daqueles observados na regeneração compensatória. Assim, enquanto a ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B e a expressão aumentada de genes precoces imediatos tais como *c-fos*, *c-jun*, *egr-1* e *c-myc* são induzidas durante a regeneração compensatória, tais alterações não são

observadas durante a hiperplasia induzida por certos mitógenos primários (STEER, 1995; COLUMBANO e SHINOZUKA, 1996). Além disso, descreveu-se que os níveis das quinases dependentes de ciclina CDK4 e CDK5, bem como da proteína ciclina D3, importantes para o controle do ciclo celular normal, aumentam após hepatectomia parcial mas não após administração de WY14.643, um proliferador de peroxissomos com potente atividade mitogênica hepática (RININGER *et al.*, 1997).

Ainda nesse sentido, apesar de evidências experimentais sugerirem um papel crítico para fatores de crescimento do tipo do fator de crescimento do hepatócito (HGF) e do transformante α (TGF- α) para a progressão no ciclo celular de hepatócitos competentes na regeneração compensatória, estes não parecem desempenhar um importante papel na hiperplasia mitógeno-induzida (COLUMBANO e SHINOZUKA, 1996).

Portanto, essas diferenças em eventos moleculares observados entre as hiperplasias compensatória e direta podem afetar de forma diversa, as diferentes etapas da hepatocarcinogênese química.

Assim, apesar de não ser conhecido o mecanismo exato através do qual esta atua na iniciação, foi ressaltado o envolvimento da proliferação celular na fixação de uma eventual lesão no DNA recém sintetizado (COLUMBANO *et al.*, 1981). Na maioria dos estudos designados nesse sentido, o estímulo proliferativo foi realizado através de regeneração compensatória. Nessas circunstâncias, a regeneração hepática é de fato necessária à iniciação por agentes químicos. Entretanto, demonstrou-se também, que doses de carcinogênicos que induzem o evento de iniciação quando acopladas à regeneração hepática, foram incapazes de iniciar as células hepáticas quando associadas à proliferação celular induzida por mitógenos diretos (COLUMBANO *et al.*, 1987; COLUMBANO e SHINOZUKA, 1996). Além disso, foi observada incapacidade da hiperplasia direta em dar suporte à iniciação por carcinogênicos químicos, apesar da presença de lesão do DNA.

Não está ainda claro, portanto, se esta incapacidade se deve à deficiência de algum evento molecular necessário à iniciação, ou se as células iniciadas são formadas e preferencialmente eliminadas por apoptose durante o processo subsequente de regressão da hiperplasia inicial. Nesse sentido, sugeriu-se, ainda, que a eliminação de numerosas células alteradas por carcinogênicos ocorre "espontaneamente" logo após a iniciação (DRAGAN *et al.*, 1994a).

Uma outra etapa em que a proliferação celular exerce um efeito crítico na hepatocarcinogênese, é a da promoção de células iniciadas por carcinogênicos (DRAGAN *et al.*, 1994b). Assim, descreve-se um aumento na incidência de lesões pré-neoplásicas e neoplasias após regeneração compensatória induzida por hepatectomias parciais repetidas ou múltiplos tratamentos com agentes necrogênicos (POUND e MCGUIRE, 1978; DRAGANI *et al.*, 1986; COLUMBANO *et al.*, 1990). Por outro lado, nesse sentido o efeito da hiperplasia mitógeno-induzida é ainda controverso, devido em parte ao fato de alguns mitógenos diretos, como por exemplo os proliferadores de peroxissomos, também apresentarem, concomitantemente, atividade como carcinogênicos completos (RAO e REDDY, 1987).

Entretanto, têm se acumulado evidências de que alguns mitógenos primários, apesar de suas capacidades de estimularem a proliferação de hepatócitos normais, exercem, na verdade, um efeito inibitório *in vivo* sobre a proliferação celular de lesões pré-neoplásicas hepáticas (CHEN *et al.*, 1994; COLUMBANO e SHINOZUKA, 1996).

A persistência de uma taxa aumentada de proliferação celular pode também influenciar a etapa de progressão da hepatocarcinogênese. Assim, demonstrou-se que apesar das células alteradas presentes na etapa de progressão da hepatocarcinogênese já apresentarem um crescimento autônomo, este processo foi influenciado pela presença ou não de um agente

promotor, o que se evidenciou pela redução no período de latência do surgimento da neoplasia na presença contínua desse agente, quando comparado à ausência do mesmo (DRAGAN *et al.*, 1993). Além disso, ao contrário da esperada redução na proliferação celular após suspensão da administração do agente promotor, ratos submetidos a um protocolo de hepatocarcinogênese no qual se utilizou o agente progressor etilnitrosouréia, apresentaram manutenção na proliferação celular de focos de hepatócitos marcados pela enzima GST-P, por ocasião da suspensão da administração de fenobarbital (DRAGAN *et al.*, 1994b).

Deste modo, considera-se que a proliferação celular desempenhe um importante papel nas várias fases da hepatocarcinogênese, ou seja, na iniciação, promoção e progressão, tendo-se ainda constatado que esta aumenta gradualmente dos tecidos normais ao carcinoma, incluindo nessa sequência os tecidos pré-neoplásicos e, a seguir, o adenoma (FARBER e SARMA, 1987; FARBER, 1991b; DRAGAN *et al.*, 1994b; ZERBAN *et al.*, 1994).

Assim, um dos possíveis mecanismos eventualmente responsável pelas atividades anti-neoplásicas do β -caroteno ou da vitamina A poderia envolver uma inibição da proliferação celular.

Portanto, foram realizadas no presente estudo avaliações em que se utilizou inicialmente um método bioquímico simples capaz de determinar quantitativamente as concentrações hepáticas de DNA e, deste modo, de indicar rapidamente a ocorrência ou não de variações na proliferação celular e, a seguir, determinações do índice de marcação da BrDU através de técnica imunohistoquímica já bem mais sensível e específica que a anterior, também amplamente empregada com essa finalidade em estudos de carcinogênese (MELNICK, 1992; DOLBEARE, 1995; FOSTER, 1997).

Observou-se, logo de início, em comparação ao grupo controle (grupo OM) que a administração por oito semanas consecutivas de β -caroteno ou vitamina A após 40 semanas da realização do processo de iniciação com o carcinogênico DEN, reduziu significativamente ($p < 0,05$) as concentrações de DNA nos fígados de animais submetidos ao modelo do RH (Tabela 5).

Da mesma forma, constatou-se posteriormente que tanto o tratamento com o carotenóide (grupo β C) como com o retinóide (grupo VA) foram capazes de reduzir o índice de marcação para a BrDU dos hepatócitos em áreas consideradas "normais" ao redor de lesões hepáticas (nódulos/cânceres), bem como nas próprias lesões, embora essa diferença não tenha atingido significância estatística em relação ao respectivo grupo controle, especificamente apenas no caso das lesões constatadas nos fígados de animais aos quais se administrou a vitamina A (Tabela 6).

Portanto, conjuntamente tais resultados se constituem em fortes indícios de que o β -caroteno e a vitamina A apresentam um efeito inibitório na proliferação celular quando administrados durante a etapa de progressão da hepatocarcinogênese e confirmam dados de um trabalho recente em que tal atividade foi também detectada em ratos Wistar submetidos ao modelo do RH, após tratamento com o retinóide também por oito semanas consecutivas e durante a mesma fase da carcinogênese hepática (SILVEIRA, 1998).

Constatou-se ainda no presente estudo através da determinação do índice de marcação para a BrDU que áreas hepáticas consideradas "normais" ao redor das lesões de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho durante a fase de progressão (grupo OM — controles), apresentavam uma maior proliferação de hepatócitos ($p < 0,05$) que amostras de fígado obtidas de ratos que não foram submetidos a esse protocolo de hepatocarcinogênese (Tabela 6).

Além disso, observou-se que lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno

(grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) demonstravam uma maior proliferação celular do que em suas respectivas áreas de fígado consideradas "normais" aos seus redores, embora estas diferenças tenham alcançado significância estatística ($p < 0,05$) somente nos dois primeiros grupos experimentais (Tabela 6).

Tais resultados estão, portanto, também de acordo com as evidências da literatura já citadas anteriormente (FARBER e SARMA, 1987; FARBER, 1991b; DRAGAN *et al.*, 1994b; ZERBAN *et al.*, 1994) e que demonstram que a proliferação celular aumenta à medida que a hepatocarcinogênese evolui.

Observações semelhantes às do presente estudo foram também constatadas em investigações realizadas *in vitro* em que se observou que o carotenóide foi capaz de inibir a proliferação de fibroblastos C3H 10T1/2 de embriões de camundongo (PUNG *et al.*, 1988), de células B-16 de melanoma de camundongo (HAZUKA *et al.*, 1990), bem como de células SK-MES de carcinoma pulmonar e SCC-25 de carcinoma oral de ser humano (SCHWARTZ *et al.*, 1990; 1992).

Além disso, estas estão ainda de acordo com as evidências de três estudos já publicados mais recentemente em que se demonstrou, em um deles, realizado com culturas de células da linhagem osteogênica clonal MC3T3-E1, que tanto o β -caroteno como o retinol foram capazes de inibir a proliferação celular e a capacidade de síntese de DNA (PARK *et al.*, 1997), e nos dois outros, realizados com culturas de células HL-60 originárias de paciente portador de leucemia promielocítica, em que a incubação com o carotenóide por períodos e em concentrações variáveis resultou em uma inibição significativa de seus números (GROSS *et al.*, 1997; BIESALSKI e SCHÄFFER, 1997).

Nessas duas últimas investigações, como também no presente estudo, os resultados sugeriram que o β -caroteno poderia estar eventualmente atuando de forma intrínseca diretamente relacionada com sua molécula intacta, e não como pró-vitamina A. No primeiro caso tal conclusão se baseou na constatação de que tanto o β -caroteno como a luteína, um carotenóide sem atividade pró-vitáminica A, foram capazes de inibir significativamente a proliferação de células HL-60 (GROSS *et al.*, 1997) e, no segundo, no fato de não se ter constatado nas culturas a presença concomitante de ácido retinóico que pudesse ter sido produzido a partir do carotenóide presente no meio de incubação (BIESALSKI e SCHÄFFER, 1997).

Pelo número exíguo de publicações encontrado na literatura especializada, pode-se constatar que em apenas algumas outras poucas oportunidades que não no atual estudo, procurou-se também avaliar *in vivo* os efeitos do β -caroteno na proliferação celular.

Assim, descreveu-se em um modelo de carcinogênese de língua induzida em ratos Machos F-344 pelo 1-óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) que o β -caroteno administrado nas rações dos animais (500 p.p.m.) durante as fases de iniciação e pós-iniciação reduziu significativamente as incidências de lesões pré-neoplásicas e de carcinomas de língua por ocasião do sacrifício na 32ª semana, as concentrações teciduais das poliaminas diâmina, espermidina e espermina, bem como a proliferação celular estimada pelo índice de marcação para a BrDU e por análises morfológicas de regiões organizadoras nucleolares coradas pela prata (AgNORs) (TANAKA *et al.*, 1994).

Aumentos das concentrações de poliaminas e/ou da atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC), considerada a etapa crítica na biossíntese das poliaminas, correlacionaram-se em diversos tecidos com a taxa de síntese de DNA e a proliferação celular, tendo-se ainda atribuído um importante papel para a enzima na promoção de neoplasias em vários modelos de carcinogênese (PEGG, 1988).

Por outro lado, relatou-se também já mais recentemente que a administração de β -caroteno nas rações durante as etapas de iniciação/promoção inicial ou durante a promoção tardia resultou em efeitos quimiopreventivos em modelo de carcinogênese pancreática induzida em ratos pela aplicação de azasserina, embora tenha aumentado paradoxalmente nessas ocasiões a proliferação celular em focos acinares atípicos, determinada pelo índice de marcação para a BrDU (APPEL e WOUTERSEN, 1996).

Já em seres humanos, para os quais vem sendo inclusive considerada como promissora e recomendada para ensaios de quimioprevenção em pequena escala a utilização de biomarcadores de proliferação celular no colon do tipo da determinação do índice de marcação para a BrDU ou da atividade da enzima ODC (BOWEN e MOBARHAN, 1995; GERSTER, 1996), observou-se em um estudo conduzido em grupos constituídos de 10 pacientes que receberam ou não suplementos de β -caroteno (9 mg), vitamina E (160 mg) ou vitamina C (750 mg) diariamente por quatro semanas consecutivas, respectivamente, que tanto o carotenóide como a vitamina C foram capazes de inibir significativamente o índice de marcação para a BrDU enquanto isto não ocorreu no grupo não-suplementado ou suplementado com vitamina E (CAHILL *et al.*, 1993).

Além disso, descreveu-se que em um grupo de vinte pacientes que haviam sofrido ressecção prévia de um adenocarcinoma de colon, a suplementação diária com β -caroteno (30 mg) por 6 meses, reduziu significativamente em 44% ($p < 0,05$) após duas semanas a atividade da enzima ODC em amostras de biópsia retal em comparação à atividade constatada quando do início do estudo, e em 57% ($p < 0,01$) após 9 semanas. Após 16 e 24 semanas constatou-se ainda nesse caso, reduções na atividade dessa enzima correspondentes a 30% e 35%, respectivamente (PHILLIPS *et al.*, 1993).

Da mesma forma, observou-se ainda em um ensaio conduzido em pacientes portadores de gastrite atrófica e cujas atividades da enzima ODC na mucosa gástrica já se encontravam previamente elevadas, que o tratamento diário com 20 mg de β -caroteno por três semanas consecutivas resultou em uma redução significativa na atividade da enzima, em comparação a controles não-tratados (BUKIN *et al.*, 1993).

É também pequeno o número de estudos relatados na literatura em que se avaliou os eventuais efeitos da vitamina A na proliferação celular, ao contrário do que se observa em relação ao ácido retinóico e a diversos retinóides sintéticos.

Assim, constatou-se *in vitro* através de técnicas de autorradiografia com timidina tritiada, que a vitamina A foi capaz de inibir significativamente a síntese de DNA e a proliferação celular quando adicionada ao meio de cultura de células de carcinomas escamosos ou basais de pele, induzidos em camundongos pela aplicação de 3-metilcolantreno (LUPULESCU, 1986; 1993).

Observou-se também um efeito inibitório por parte do acetato de retinila na estimulação da síntese de DNA induzida pelo soro em fibroblastos C3H 10T1/2 tratados com carcinogênico, provavelmente decorrente de um bloqueio na transição da etapa G0 para G1 da resposta mitótica das células iniciadas a fatores de crescimento plaquetários (MORDAN, 1989).

Já em experimentos *in vivo*, teve-se também a oportunidade de demonstrar em ratos submetidos a modelo de carcinogênese mamária induzida pela administração de DMBA ou MNU e alimentados com rações suplementadas com acetato de retinila, a ocorrência de uma inibição da síntese de DNA quando esta foi determinada através da incorporação de timidina tritiada (MOON e MEHTA, 1986).

Demonstrou-se ainda que em ratos uma única injeção intraperitoneal do agente promotor acetato de tetradecanoilforbol (TPA) resultou em um aumento transitório da atividade da enzima ODC no fígado, o qual foi inibido quando se administrou o acetato de retinila nos animais uma hora antes da aplicação do TPA (BISSCHOP *et al.*, 1981).

Portanto, os efeitos anti-neoplásicos do β -caroteno e da vitamina A observados no presente estudo durante a etapa de progressão da hepatocarcinogênese podem ter sido também eventualmente mediados por uma inibição da proliferação celular. Além disso, no caso específico do carotenóide talvez este efeito inibitório possa ser ainda relacionado a algum mecanismo intrínseco dependente diretamente da estrutura de sua molécula e não à sua ação como pró-vitamina A.

Dos muitos eventos que acontecem no interior de uma célula durante toda sua existência, a divisão em duas consiste em um dos mais complexos, sendo assim fundamental para a vida que ocorra com sucesso.

É o estado de diferenciação da célula que vai ditar quando e sob quais circunstâncias esta proliferará. Em geral células diferenciadas proliferam em resposta a sinais extracelulares específicos e que incluem hormônios e citocinas estimulatórias ou inibitórias da proliferação, a matriz extracelular ou substrato das células com que estas estabelecem contato, e o tipo e grau de proximidade com as células vizinhas. Os mesmos fatores são também frequentemente importantes reguladores da diferenciação (OSHIMA e CAMPISI, 1991).

Entende-se por ciclo celular o processo no qual uma única célula eucariótica dá origem a duas células filhas, através de quatro etapas em série biologicamente definidas e designadas por: G1 ("gap" 1); S (ou de síntese do DNA); G2 ("gap" 2) e M (de mitose) (REDDY, 1994). A conclusão da sequência de eventos metabólicos específicos de cada uma delas prepara a célula para a etapa seguinte.

Na maioria dos tecidos as células se encontram em um estado quiescente, não-proliferante, denominado de "G0". Ao contrário de células terminalmente diferenciadas, as em G0 retêm a capacidade de entrar no ciclo celular proliferativo, respondendo a fatores extracelulares (REDDY, 1994).

O controle do ciclo celular constitui o principal mecanismo regulatório da proliferação, sendo em geral exercido nas etapas G0 para G1 e em G2. Os mecanismos que operam nesta última parecem ser comuns a todas as células, enquanto diversos eventos específicos a cada tipo de célula tendem a operar na etapa G1 (OSHIMA e CAMPISI, 1991).

Assim, dependendo das condições extracelulares, a "decisão" para uma célula em G0 entrar no ciclo celular ou para as células que nele se encontram ciclando saírem novamente para essa etapa é adotada, em última instância, pouco antes da fase S e em um período tardio da etapa G1 (REDDY, 1994).

Descreve-se, ainda, que a divisão celular poderia também ser separada em quatro outras fases distintas que incluiriam: a geração do sinal, reconhecimento do mesmo, sua transdução e, finalmente, a resposta, ou seja, a replicação do DNA e a divisão celular (BOS e van KREIJL, 1992; FOSTER, 1997).

O início do processo está sob controle de um sinal externo, que pode ser tanto um fator humoral como local. Exemplos seriam hormônios tais como insulina e estrógenos, citocinas como o fator α de necrose tumoral (TNF- α) e fatores de crescimento incluindo o do hepatócito (HGF) e o epidermal (EGF), que estimulam a proliferação de uma ampla variedade de células epiteliais no fígado, pele e estômago (LINDROOS *et al.*, 1990; DIEHL e RAI, 1996).

Já o reconhecimento do sinal para proliferação requer a presença de receptores seja na membrana plasmática das células, no citoplasma ou no núcleo (CARPENTER, 1987).

A interação dos hormônios ou fatores de crescimento com os receptores apropriados resulta em uma sequência de eventos conhecida coletivamente como transdução do sinal, que pode terminar, por sua vez, em uma série de diferentes processos tais como a replicação celular, síntese de proteínas ou até mesmo na apoptose (FOSTER, 1997).

Eventos comuns que ocorrem após a ligação aos receptores, como por exemplo ao receptor EGF, incluem a dimerização ou oligomerização do receptor, ativação da via do fosfatidilinositol, estimulação de proteína quinase C serina/treonina específica e mobilização dos depósitos intracelulares de cálcio. A fosforilação concomitante de proteínas ricas em tirosina e serina torna possível a liberação de fatores de transcrição de seus locais citoplasmáticos de ancoragem, possibilitando que estes sejam translocados para o núcleo e ativem a expressão gênica (ULRICH e SCHLESSINGER, 1990).

Já a produção das assim chamadas trifosfatases de guanosina (GTPases), incluindo p21ras, e a ativação de quinases transdutoras como a quinase peptídeo mitógeno ativado resultam em uma série de alterações para o preparo da síntese do DNA e da replicação celular (BOS e van KREIJL, 1992).

Os proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun* e *c-myc* que atuam como fatores de transcrição são comumente ativados em consequência da ligação com o receptor e da transdução do sinal, podendo ocorrer a ativação e fosforilação após estimulação das células com uma diversidade de agentes tais como ésteres de forbol, ionóforos de Ca^{2+} , neurotransmissores, citocinas e fatores de crescimento (BISHOP, 1991; EDWARDS, 1994).

Já os produtos dos anti-oncogenes *p53* e *rb* são capazes de exercerem uma influência controladora sobre os eventos moleculares que induzem a célula a proliferar, bloqueando a progressão no ciclo celular da etapa G1 para S (BISHOP, 1991; REDDY, 1994; BURDON, 1995).

Além disso, para que a célula responda adequadamente à interação do fator de crescimento com seu respectivo receptor e entre na etapa G1 do ciclo celular, são necessárias ainda ciclinas, proteínas que são sintetizadas e degradadas em diferentes etapas do ciclo de divisão celular, bem como uma proteína quinase específica codificada pelo gene para o fator promotor da maturação/mitose (MPF; *cdc2/CDC28* em leveduras) (BISHOP, 1991; ROBERTS, 1993).

A ligação dessa proteína quinase a uma ciclina forma um complexo que determina a passagem das células por G1e para a etapa S (de síntese do DNA), e que foi denominado de "ponto de restrição". Este corresponde ao momento decisivo na etapa G1 tardia em que ocorre a definição se a célula irá se dividir ou diferenciar entrando novamente em G0 (FOSTER, 1997).

A transição subsequente de uma etapa para outra do ciclo celular é regulada por uma combinação de mecanismos transcricionais, pós-tradução e de associações quaternárias de proteínas, em que ciclinas e proteína quinases ciclina-dependentes (CDKs) desempenham importantes papéis, bem como a fosforilação de várias subunidades protéicas (JACOBS, 1992; FOSTER, 1997).

Assim, as CDKs 2, 4 e 5 em conjunto com as ciclinas C, D e E foram implicadas com a passagem pela etapa G1 do ciclo celular, enquanto CDK1 e CDK2 e as ciclinas A e B parecem ser críticas durante as etapas S e M (VAN DEN HEUVEL e HARLOW, 1993; HUNTER e PINES, 1994; NURSE, 1994).

Proteínas inibitórias (CDIs) incluindo p21 (WAF1/CIP1), p27 (Kip1) e p16 (Ink4), também contribuem para a regulação da progressão no ciclo celular, controlando a atividade de CDKs; p16 é específica para complexos ciclina-CDK4 enquanto p21 e p27 inibem *in vitro* uma ampla variedade de complexos ciclina-CDKs, incluindo complexos CDK2 e CDK4. A hiperexpressão dessas proteínas bloqueia a progressão das células pela etapa G1 (HUNTER e PINES, 1994).

A transformação de uma célula normal em uma que prolifera de modo descontrolado consiste em um processo altamente complexo em múltiplas etapas e que não é ainda completamente compreendido. Teoricamente espécies reativas de oxigênio podem desempenhar um papel em todas as fases da carcinogênese, mas de que forma isto ocorre também não está ainda claro (FRENKEL, 1992; SLAGA, 1995).

Evidências demonstram que uma ampla variedade de células normais e malignas produz e libera *in vitro* superóxido ou peróxido de hidrogênio em resposta a estímulos por citocinas e fatores de crescimento específicos ou constitutivamente no caso das células neoplásicas, tendo-se sugerido que intermediários reativos de oxigênio poderiam desempenhar um importante papel como mensageiros secundários intra e intercelulares (BURDON, 1995; SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1997). Estes poderiam contribuir para com a transdução do sinal mediada por alterações na fosforilação de proteínas ricas em tirosina através de ações nas atividades de quinases e fosfatases, bem como para com a regulação de fatores de transcrição tais como NF- κ B, AP-1, c-myc, c-fos e p53, e desta forma atuar no controle da proliferação celular (BURDON, 1995; SEN e PARKER, 1996; POWIS *et al.*, 1997; PRIMIANO *et al.*, 1997; SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1997; WASSERMAN e FAHL, 1997).

De fato, observou-se que tanto o superóxido como o peróxido de hidrogênio quando adicionados exogenamente podem estimular a proliferação celular de uma variedade considerável de células de mamíferos em cultura (BURDON, 1995).

Por outro lado, experimentos nos quais se adicionou as enzimas antioxidantes superóxido dismutase ou catalase exogenamente ao meio de cultura de fibroblastos de hamster ou rato (BURDON, 1992), bem como de células promielocíticas HeLa (BURDON e GILL, 1993), resultaram em diminuição da proliferação celular.

Da mesma forma, descreve-se que o tratamento com superóxido dismutase miméticos (EGNER e KENSLER, 1985) ou a transferência do gene da enzima superóxido dismutase (CHURCH *et al.*, 1993), inibiu a progressão da carcinogênese de pele em camundongos e reverteu o fenótipo neoplásico de células de melanoma humano, respectivamente.

Portanto, talvez antioxidantes como o β -caroteno poderiam inibir a proliferação celular através de suas capacidades de neutralizar espécies reativas de oxigênio que atuam como uma espécie de mensageiros secundários, com consequente inibição da ativação de vias da transdução do sinal e de fatores de transcrição como o NF- κ B, c-myc (que desempenha um papel essencial na proliferação celular), c-fos e AP-1 (BURDON, 1995; SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1997; NAVES e MORENO, 1998).

Vale entretanto também lembrar que os efeitos quimiopreventivos de carotenóides contra o câncer parecem depender não apenas diretamente de suas estruturas, com duplas ligações capazes de sequestrarem espécies reativas de oxigênio ou radicais livres e assim atuarem como antioxidantes, como também de outros mecanismos que influenciam concomitantemente a expressão de genes importantes para a regulação da proliferação e da diferenciação celulares (NAVES e MORENO, 1998).

Esta sugestão está de acordo com a descrição de que o β -caroteno pode induzir a expressão da proteína quinase cdc2 (um dos reguladores do ciclo celular), das ciclinas A e D, de proteínas relacionadas com o estresse e do anti-oncogene p53 selvagem, enquanto inibe a expressão do p53 mutante, do receptor para o fator de crescimento epidermal (EGF), do fator de transcrição c-fos e do proto-oncogene c-raf, que também codifica para proteína quinase envolvida com o controle do ciclo celular (SCHWARTZ *et al.*, 1990; 1993; SCHWARTZ, 1994; BURDON, 1995; MUTO *et al.*, 1995), bem como inibe a hiperfosforilação de proteínas celulares o que talvez tivesse alguma correlação, inclusive, com a observação de que este carotenóide é capaz de bloquear o ciclo celular nas etapas G0/G1 e G2 (SCHWARTZ *et al.*, 1992; 1993; SCHWARTZ, 1994; MATSUSHIMA-NISHIWAKI *et al.*, 1995).

Esta ainda de certa forma de acordo com a constatação de que a ativação do fator de transcrição NF- κ B pode ser prevenida quando as células em cultura são pré-tratadas com compostos antioxidantes do tipo da vitamina E, N-acetilcisteína, ácido lipóico, tioredoxina, ditiocarbamatos e fenólicos como o hidroxianisol butilado (SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1995; 1997).

Além disso, concorda também com a observação de que o β -caroteno inibe a expressão do proto-oncogene *c-myc* de uma forma intrínseca e independente de sua ação como pró-vitamina A, quando esta foi utilizada como um parâmetro para estimativa da proliferação celular em papilomas de camundongos tratados com o carotenóide (KATSUMURA *et al.*, 1996), bem como a transdução do sinal dependente da atividade da proteína quinase C em células SW480 de carcinoma de cólon humano (KAHL-RAINER e MARIAN, 1994; GERSTER, 1996).

Todavia, não está de acordo com a constatação de certo modo surpreendente, de que o fator AP-1 sofre importante ativação após tratamento das células em cultura com diversos antioxidantes estruturalmente não-relacionados (SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1997).

Entretanto, no caso específico desse fator de transcrição, pode-se aventar que o β -caroteno poderia também estar atuando através de sua ação como pró-vitamina A e não como antioxidante, pois se descreve que o fator de transcrição AP-1 também pode ser inativado por retinóides através de sua interação com os receptores RAR e RXR, por um mecanismo denominado de transrepressão (SALBERT *et al.*, 1993; SILVEIRA e MORENO, 1998).

Além disso, o β -caroteno poderia também inibir a proliferação celular através de sua capacidade de estimular a formação de junções do tipo hiato ("gap junctions") via indução da expressão do gene para a conexina 43 (ZHANG *et al.*, 1992; 1995), ou de inibir a enzima HMGCoA redutase, cuja atividade é considerada crítica para o metabolismo do colesterol e de outros derivados do mevalonato necessários não só à síntese de membranas celulares em animais, como também à própria síntese do DNA (SOMA *et al.*, 1992; MORENO *et al.*, 1995; FUHRMAN *et al.*, 1997).

Finalmente, o β -caroteno poderia estar ainda inibindo a proliferação celular através de uma estimulação da diferenciação, o que altera o fenótipo da célula e reduz as alterações associadas com a malignidade e a proliferação (CASEY, 1991), como o observado em culturas de células da linhagem osteogênica clonal MC3T3-E1 (PARK *et al.*, 1997), de células HL-60 de leucemia promielocítica aguda (BIESALSKI e SCHÄFFER, 1997; GROSS *et al.*, 1997) e de células F9 de carcinoma embrionário (NIKAWA *et al.*, 1995).

Como já mencionado anteriormente, no caso dos estudos realizados com culturas de células HL-60, o β -caroteno pareceu também estar atuando diretamente na diferenciação das células e não na forma de pró-vitamina A (BIESALSKI e SCHÄFFER, 1997; GROSS *et al.*, 1997). Já em culturas de células F9, descreve-se que provavelmente atuou após sua transformação em ácido retinóico (NIKAWA *et al.*, 1995).

Assim, este mecanismo também está classicamente relacionado à atividade antiproliferativa dos retinóides, constituindo inclusive a base racional da assim denominada "terapia de diferenciação" da leucemia promielocítica aguda com ácido retinóico *todo-trans* (HUANG *et al.*, 1988; BOONE *et al.*, 1990, 1992; WARRELL *et al.*, 1993; GUDAS *et al.*, 1994; CHOMIENNE *et al.*, 1996; SILVEIRA e MORENO, 1998).

Já em relação aos mecanismos através dos quais a vitamina A poderia estar inibindo a proliferação celular, acredita-se que estes estejam relacionados, primariamente, a seu metabolismo em ácido retinóico. Este modularia, por sua vez, de uma forma direta ou indireta as expressões dos inúmeros genes cujos produtos estão envolvidos com o controle das várias etapas da divisão celular, basicamente graças à sua interação inicial com os receptores nucleares RAR e RXR, bem como com as proteínas ligadoras de ácido retinóico (CRABPs) (GUDAS *et al.*, 1994; CHAMBON, 1996; SILVEIRA e MORENO, 1998).

Alguns exemplos desses mecanismos já aventados na literatura e que se basearam em evidências obtidas a partir de estudos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* e nos quais se demonstrou uma inibição da proliferação celular após tratamento com o ácido retinóico incluiriam: uma ação estimulante da atividade do fator inibitório da proliferação celular

denominado de fator β transformante do crescimento (TGF- β), aumentando tanto a expressão do ligante como de seu receptor; uma atividade inibitória da expressão de fatores mitogênicos como o fator α transformante do crescimento (TGF- α), o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento I insulina-símile (IGF-I); uma inibição da expressão do gene para a enzima ODC; uma atividade modulatória sobre as junções do tipo hiato e da expressão do gene para a conexina 43; e um efeito inibitório da expressão de proto-oncogenes tais como *c-fos* e *c-jun*, cujas proteínas formam o dímero AP-1, bem como *c-myc*, *c-myb* (GUDAS *et al.*, 1994).

Além disso, descreve-se que retinóides, mais especificamente o retinol, poderiam ser fosforilados e subsequentemente glicosilados com manose dando origem ao fosfato de manosilretinila, que altera propriedades da membrana plasmática incluindo a secreção, assim modulando a proliferação e a diferenciação celulares (JETTEN, 1984).

Retinóides em concentrações elevadas ao penetrarem nas membranas poderiam ainda causar mudanças em seus domínios e propriedades físicoquímicas como a microviscosidade, com consequentes alterações na permeabilidade a íons e nas atividades de enzimas ligadas à membrana, o que também explicaria a modulação da proliferação celular exercida por essas substâncias (JETTEN, 1984).

Já bem mais recentemente demonstrou-se ainda que o ácido retinóico pode interferir com a progressão do ciclo celular e dessa forma reduzir a proliferação de células MCF-7 de carcinoma mamário humano, inibindo inicialmente as expressões da ciclina D3 e da proteína quinase CDK4 e, a seguir, a expressão e a fosforilação do produto do gene do retinoblastoma (pRB), uma proteína nuclear que funciona como um antioncogene, bem como a expressão subsequente do fator de transcrição E2F1 que controla a progressão da fase G1 para S (ZHU *et al.*, 1997).

6.6 Sobre o padrão de metilação dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, bem como do gene que codifica para a enzima HMGCoA redutase, do fígado e de lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" e tratados com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Alterações no padrão de metilação do DNA foram correlacionadas com diversos processos em mamíferos, incluindo a expressão de genes, a estrutura da cromatina, a replicação do DNA, a impressão genômica parental, uma forma de controle de genes autossômicos em que apenas um dos dois alelos se encontra transcricionalmente ativo dependendo se este foi herdado do pai ou da mãe, e a inativação do cromossomo X somático no sexo feminino (RAZIN e CEDAR, 1991; 1994; JONES, 1996; ZINGG e JONES, 1997).

Além disso, diversas observações demonstram que a metilação do DNA também desempenha um papel nos processos de diferenciação e proliferação celular e na patogenia do câncer (KANDUC *et al.*, 1991; COUNTS e GOODMAN, 1995; JONES, 1996; ZINGG e JONES, 1997).

Assim, foram observadas amplas alterações no padrão de metilação do DNA de todo o genoma, bem como variações regionais em genes específicos, em uma série de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* de carcinogênese (COUNTS e GOODMAN, 1995; JONES, 1996).

Justamente graças a esse motivo tem sido difícil até o momento o estabelecimento de uma relação causa-efeito definitiva entre a metilação do DNA e a transformação maligna, pois hipometilação global e hipermetilação regional podem coexistir no genoma de uma ampla variedade de cânceres do ser humano e de animais.

A hipótese implícita nos diversos estudos a respeito da associação entre a metilação do DNA e a carcinogênese é de que a hipometilação de proto-oncogenes e/ou a hipermetilação de anti-oncogenes alteraria a ligação de fatores de transcrição e a expressão desses genes, promovendo uma vantagem seletiva para a célula iniciada. Portanto, a hipometilação do DNA poderia aumentar a expressão de proto-oncogenes e a hipermetilação silenciar anti-oncogenes (COUNTS e GOODMAN, 1995).

Uma outra alternativa seria de que a hipo ou a hipermetilação poderia levar à transformação maligna através da indução de modificações regionais na conformação do DNA e na estrutura da cromatina. Tais alterações promoveriam uma instabilidade genômica facilitando o acesso de sequências específicas a agentes capazes de lesar o DNA ou tornando a cromatina menos acessível a fatores de transcrição e, portanto, transcricionalmente inativa (LEWIS e BIRD, 1991; RIDEOUT III *et al.*, 1994; ZINGG e JONES, 1997).

Descreve-se também nesse sentido que a perda de citosinas metiladas altera a conformação e a estabilidade da estrutura da cromatina através de uma redução nos sítios de ligação para proteínas metil-específicas. Na ausência dessas proteínas as sequências comprometidas do DNA se tornam mais acessíveis à quebra da cadeia do DNA induzida por enzimas ou oxidantes (SZYF *et al.*, 1986; SMITH, 1991; LETEURTRE *et al.*, 1994).

Além disso, sabe-se que a substituição da guanina pela 8-hidroxi guanina, um dos produtos mais prevalentes da lesão do DNA por espécies reativas de oxigênio, altera profundamente a metilação das citosinas adjacentes, o que sugere um papel para a injúria oxidativa na formação de padrões aberrantes de metilação do DNA durante a carcinogênese (CERDA e WEITZMAN, 1997).

Portanto, talvez antioxidantes como o β -caroteno pudessem contribuir para a manutenção de uma metilação adequada do DNA através da capacidade que apresentam de reduzir o estresse oxidativo, e que este fosse, inclusive, um dos mecanismos eventualmente associado com seus efeitos anticarcinogênicos.

Uma das formas de controle do padrão de metilação é através da regulação do gene que codifica para a DNA metiltransferase (DNA MeTase), a enzima que cataliza a transferência de grupamentos metila para o DNA. Aumentos na expressão desse gene caracterizam muitas linhagens de células cancerosas e de pólipos e carcinomas de cólon do ser humano, tendo-se sugerido que esses aumentos poderiam desempenhar um papel na instabilidade genética que caracteriza o câncer e marcar eventos iniciais na transformação celular (EL-DEIRY *et al.*, 1991; ROULEAU *et al.*, 1995).

Observou-se que a região regulatória 5' do gene para a enzima DNA MeTase possui três sítios de ligação para o fator de transcrição AP-1, podendo ainda este promotor ser induzido pelos proto-oncogenes *c-jun* ou *c-Ha-ras*, o que explicaria a hiperatividade dessa enzima observada em muitas linhagens de células cancerosas. Constatou-se, além disso, que a ativação do promotor por *c-jun* era inibida de modo ligante-dependente pelo receptor para glicocorticóide, sendo portanto provavelmente mediada por interações do tipo proteína-proteína com o fator AP-1 (ROULEAU *et al.*, 1995).

Existe, portanto, a possibilidade de que retinóides e até mesmo o β -caroteno agora atuando como pró-vitamina A, possam vir a interferir da mesma forma que o receptor para glicocorticóide com a ativação do gene para a DNA MeTase através de suas reconhecidas capacidade de transrepressão do fator AP-1 (SALBERT *et al.*, 1993; SILVEIRA e MORENO, 1998), e deste modo também influir na metilação do DNA.

Baseado nessas premissas decidiu-se por avaliar no presente estudo o padrão de metilação dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, bem como do gene que codifica para a enzima HMGCoA redutase, do fígado de ratos Wistar submetidos ao modelo do "hepatócito

resistente" e tratados com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese.

Optou-se especificamente por tais genes pelo fato de já se ter observado anteriormente que se apresentavam hipometilados em ratos submetidos a diferentes modelos de hepatocarcinogênese (BHAVE *et al.*, 1988; GARCEA *et al.*, 1989b; RAO *et al.*, 1989; MÜNDEL *et al.*, 1991; CONI *et al.*, 1992; ZAPISEK *et al.*, 1992), e devido ao importante papel que seus produtos desempenham tanto na proliferação celular como na carcinogênese (BISHOP, 1991; CONI *et al.*, 1992; MORENO *et al.*, 1995).

O grau de metilação dos genes nas diversas amostras de DNA foi analisado utilizando-se enzimas que detectam a metilação no dímero CpG, pois uma citosina 5' em relação a uma guanina é de longe o sítio de metilação mais comum no DNA de animais (ADAMS, 1990).

Empregou-se, para tanto, as enzimas de restrição *Hpa* II e *Msp* I, capazes de estabelecer diferenças entre sequências metiladas e não-metiladas, pois são sensível e insensível, respectivamente, à presença de um grupamento metila na citosina no interior da sequência CCGG. Portanto, uma banda maior encontrada após digestão com a enzima *Hpa* II, e que não é observada após digestão com a enzima *Msp* I, reflete a presença da metilcitosina em um ou mais sítios CCGG (C^m CCGG) naquele fragmento de DNA. A redução no número de bandas maiores com o acúmulo de bandas menores após digestão com a enzima *Hpa* II demonstram a perda progressiva da metilação nos sítios CCGG (ZAPISEK *et al.*, 1992).

Já a presença de bandas únicas após digestão com a enzima *Msp* I, em comparação à digestão com a enzima *Hpa* II, indicam que algumas sequências CCGG no gene em questão se encontravam ainda metiladas (BUSTROS *et al.*, 1988; LIU *et al.*, 1993).

Assim, observou-se no atual estudo padrões de fragmentos de restrição bastante semelhantes entre si em relação a seus números, distribuição por tamanho e intensidade de marcação pela sonda do proto-oncogene *c-Ha-ras*, após digestão com a enzima *Hpa* II de amostras de DNA obtidas tanto de fígado de ratos normais não expostos a quaisquer tratamentos, como de lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) e áreas aos seus redores consideradas "normais" à macroscopia, de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com óleo de milho (grupo OM — controles), β -caroteno (grupo β C) ou vitamina A (grupo VA) durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese (Figura 6).

Portanto, não foram observadas neste caso alterações dignas de nota no padrão de metilação do proto-oncogene *c-Ha-ras*, do DNA de lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) obtidas de ratos sacrificados na etapa de progressão da hepatocarcinogênese.

Quando essa mesma membrana foi novamente hibridizada agora com a sonda do proto-oncogene *c-myc* (Figura 10) e, subsequentemente, com a sonda para o gene da enzima HMGC_oA redutase (Figura 12), constataram-se, entretanto, diferenças facilmente observáveis em relação aos padrões dos fragmentos de restrição após digestão do DNA com a enzima *Hpa* II.

Assim, independente do tratamento a que os animais foram expostos (óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A), observou-se que as amostras de DNA extraídas das lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) resultaram após digestão com a enzima *Hpa* II apenas em fragmentos de restrição de pequeno tamanho marcados intensamente pela sonda para o proto-oncogene *c-myc*, com desaparecimento dos fragmentos maiores constatados nas amostras de fígado de ratos normais e de áreas hepáticas ao redor das lesões (nódulos persistentes/cânceres) consideradas "normais" à macroscopia, de animais submetidos ao modelo do RH (Figura 10).

Também independente do tratamento com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A a que foram submetidos os diferentes grupos de animais, já após hibridização com a sonda para o gene da enzima HMGC_oA redutase constatou-se que estas amostras de DNA colhidas de

lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) e digeridas com a enzima *Hpa* II, resultaram em um maior número de fragmentos de pequeno tamanho e marcados mais intensamente, inclusive, do que nas amostras de DNA dos ratos normais e de áreas consideradas "normais" ao exame macroscópico do fígado de animais submetidos ao modelo do RH (Figura 12).

No caso dos três genes a digestão dos DNAs de nódulos persistentes e cânceres com a enzima *Hpa* II resultou em padrões semelhantes de fragmentos de restrição (Figuras 6, 10 e 12). Assim, não houve relação entre o estado de metilação dos mesmos nas sequências CCGG e o fato de se tratar de uma lesão pré-neoplásica ou neoplásica maligna.

Portanto, estes resultados indicam a ocorrência de hipometilação, embora com diferentes graus de intensidade dependendo do gene em questão, nas sequências CCGG do proto-oncogene *c-myc* e do gene para a enzima HMGC_oA redutase do DNA extraído de nódulos persistentes e cânceres colhidos de ratos na fase de progressão do modelo do RH.

Além disso, sugerem que o padrão de metilação dos três genes aqui estudados deve ter sido provavelmente estabelecido em etapas mais iniciais da hepatocarcinogênese que não a progressão, como demonstrado anteriormente embora em modelo utilizando o carcinogênico 1,2-dimetilhidrazina (DMH) como agente iniciante e ácido orótico como promotor em ratos F-344 (RAO *et al.*, 1989).

Como não foram observadas diferenças dignas de nota entre os padrões dos fragmentos de restrição após digestão com a enzima *Hpa* II dos DNAs de nódulos persistentes e cânceres nos três genes em questão, os resultados sugerem, ainda, que variações nos estados de metilação ao menos em suas sequências CCGG correspondentes às respectivas sondas que aqui foram utilizadas, não parecem constituir um fator que possa contribuir efetivamente para o estabelecimento da malignidade na hepatocarcinogênese. Isto não exclui, entretanto, a possibilidade que alterações específicas da metilação em outros sítios que não os de reconhecimento *Hpa* II nos três genes, possam ter uma contribuição nesse sentido.

Observações semelhantes a essa foram anteriormente relatadas durante a etapa de progressão de modelos de carcinogênese de pele (RAMSDEN *et al.*, 1985) e de fígado (BHAVE *et al.*, 1988; ZAPISEK *et al.*, 1992), tendo-se inclusive chegado a conclusões parecidas (RAMSDEN *et al.*, 1985; BHAVE *et al.*, 1988), embora a partir da constatação de hipometilação do proto-oncogene *c-Ha-ras* de papilomas, nódulos de hepatócitos e carcinomas.

Além disso, os resultados sugerem em conjunto que tanto o β -caroteno como a vitamina A não foram capazes de exercer quaisquer influências que pudessem modificar a metilação dos três genes em questão, quando administrados por oito semanas consecutivas durante essa mesma etapa da carcinogênese hepática.

Tais dados estão de acordo com as evidências de um recente estudo conduzido em ratos Wistar submetidos a um modelo do RH modificado que empregou como agente iniciante a DMH e como indutor de hipometilação a 5-azacitidina, e no qual se observou também se observou, agora *in vivo*, que tanto o β -caroteno como a vitamina A não exerceram efeitos relevantes sobre a metilação do DNA (SAMPAIO, 1998).

Vale ressaltar a essa altura que os diversos padrões dos fragmentos de restrição observados no presente estudo após digestão dos DNAs com a enzima *Hpa* II e marcação com as sondas para os três genes, foram muito semelhantes aos constatados em duas investigações relatadas anteriormente na literatura, e que também analisaram o padrão de metilação dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc* (RAO *et al.*, 1989) e do gene para a HMGC_oA redutase (CONI *et al.*, 1992), do DNA extraído de fígado de rato normal, de lesões hepáticas (nódulos persistentes e cânceres) e de áreas "normais" aos seus redores, colhidas de ratos na fase de progressão ou promoção tardia mas submetidos, no caso, ao modelo de hepatocarcinogênese "do ácido orótico".

Nas três instâncias utilizou-se sondas gênicas idênticas e da mesma procedência.

Da mesma forma que no presente estudo, constatou-se nessas duas investigações que as sequências CCGG do DNA extraído de nódulos persistentes ou cânceres se encontravam hipometiladas no proto-oncogene *c-myc* e no gene para a enzima HMGC_oA redutase, mas não no proto-oncogene *c-Ha-ras* (RAO *et al.*, 1989; CONI *et al.*, 1992). Em uma delas observou-se ainda, entretanto, que este último também se encontrava hipometilado embora na sequência GCGC (RAO *et al.*, 1989).

Após digestão agora com a enzima de restrição *Msp* I, constatou-se também no atual estudo padrões de fragmentos de restrição marcados pelas sondas dos proto-oncogenes *c-Ha-ras* (Figura 7) e *c-myc* (Figura 11), e do gene para a enzima HMGC_oA redutase (Figura 13), bastantes semelhantes entre as amostras de DNA obtidas de ratos normais (colunas a e b) e de áreas hepáticas também consideradas "normais" ao exame MACroscópico (colunas c, d e e), bem como de duas amostras de lesões (nódulo persistente/câncer) de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com β -caroteno (colunas i e l) ou vitamina A (colunas m e o).

Estes padrões de fragmentos de restrição ainda apresentaram no caso desses três genes (Figuras 7, 11 e 13), em comparação com aqueles produzidos após digestão dessas mesmas amostras de DNA com a enzima *Hpa* II (Figuras 6, 10 e 12) um maior número de bandas de menor tamanho.

Além disso, observou-se nas três amostras de lesões hepáticas (nódulo/cânceres) e em duas (nódulo/câncer; colunas f, g e h) de animais tratados com β -caroteno (coluna j) ou vitamina A (coluna n), respectivamente, também padrões de fragmentos de restrição após digestão com a enzima *Msp* I bastante semelhantes entre si, diferindo das amostras de DNA de tecidos normais por apresentarem bandas de menor tamanho e marcadas mais intensamente pelas sondas para os três genes (Figuras 7, 11 e 13), bem como com desaparecimento, inclusive, de fragmentos de maior tamanho.

Padrões de fragmentos de restrição semelhantes aos destas cinco amostras de lesões hepáticas (colunas f, g, h, j e n) foram também observados em investigação descrita anteriormente na literatura após hibridização das sondas para os proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, com os DNAs extraídos de nódulos persistentes ou cânceres e digeridos com a enzima *Msp* I. Nesse caso também se constatou, entretanto, esse mesmo padrão nas amostras de DNA extraídas de rato normal não exposto a qualquer tratamento ou mesmo de áreas hepáticas ao redor das lesões (nódulos/cânceres) de animais submetidos a modelo de hepatocarcinogênese (RAO *et al.*, 1989).

Não se encontrou uma explicação plausível que pudesse esclarecer as diferenças observadas no presente estudo em relação aos padrões dos fragmentos de restrição após digestão com a enzima *Msp* I do DNA dessas cinco amostras de lesões hepáticas e aqueles constatados em tecidos de rato normal e de áreas hepáticas "normais" ao redor das lesões.

Nesse sentido, possibilidades a serem consideradas incluiriam diferenças em relação à digestão com a enzima de restrição, o que não parece muito admissível, e que no caso teria sido mais efetiva especificamente em cinco amostras de DNA extraído de lesões hepáticas, de um total de catorze incluindo cinco de DNA extraído de tecidos considerados "normais" e quatro outras de DNA também extraído de lesões, duas de animal tratado com β -caroteno e duas com vitamina A.

Nesse último caso poder-se-ia também aventar que as quatro amostras de lesões hepáticas (2 de nódulos persistentes e 2 de cânceres) estivessem eventualmente "contaminadas" pela presença de tecido "normal" a seus redores, incluído inadvertidamente por ocasião do sacrifício dos animais, o que talvez pudesse ter resultado em um padrão de fragmentos de restrição semelhante ao de tecidos normais (Figuras 7, 11 e 12). Entretanto, vale aqui lembrar que o DNA extraído dessas amostras foi também utilizado simultaneamente para a digestão com a enzima

de restrição *Hpa* II e subsequente hibridização com os três genes (Figuras 12, 10 e 12), tendo-se constatado nas três instâncias padrões de restrição para as quatro amostras semelhantes aos das outras amostras de lesões hepáticas e idênticos aos observados e descritos anteriormente na literatura (RAO *et al.*, 1989; CONI *et al.*, 1992).

De qualquer modo, esses resultados controversos constatados no presente estudo após digestão dos DNAs com a enzima de restrição *Msp* I, não invalidam os observados após digestão dos mesmos com a enzima *Hpa* II. Assim, por exemplo, pode-se observar na literatura publicações de estudos procurando esclarecer o estado de metilação de determinados genes durante a hepatocarcinogênese, realizados tão somente com enzimas de restrição sensíveis à presença do grupamento metila na citosina tais como a *Hpa* II ou *Hha* I (CONI *et al.*, 1992).

Da mesma forma que em relação à proliferação celular, evidências sugerem que alterações na metilação do DNA desempenham um importante papel no processo geral da carcinogênese.

Os resultados do presente estudo demonstram que ocorre de fato hipometilação de genes específicos durante a etapa de progressão, ou seja, no caso, do proto-oncogene *c-myc* e do gene para a enzima HMGCoA redutase cujos produtos se correlacionam positivamente com a síntese do DNA e a proliferação celular, e que tanto o β -caroteno como a vitamina A não foram capazes de alterar esse padrão de metilação dos dois genes quando administrados durante oito semanas consecutivas nessa mesma etapa da hepatocarcinogênese.

Portanto, isto sugere que os efeitos inibitórios do β -caroteno e da vitamina A observados no presente estudo em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, bem como na proliferação celular, não parecem estar relacionados a influências que essas duas substâncias também pudessem eventualmente vir a exercer no processo de metilação do DNA.

7. CONCLUSÕES

1. A administração de β -caroteno e de vitamina A da 40ª à 48ª semana após a aplicação do carcinogênico iniciante dietilnitrosamina (DEN) reduziu a incidência de cânceres observados macroscopicamente e evidenciados ao exame histopatológico de cortes de fígado de ratos submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do "hepatócito resistente" (RH). Enquanto esse tratamento por oito semanas consecutivas com o retinóide também reduziu a incidência e o número total de nódulos persistentes de hepatócitos que estes animais ainda apresentavam, o mesmo não ocorreu após aplicação do carotenóide pelo mesmo período. Tais dados sugerem que as duas substâncias apresentam efeitos inibitórios por ocasião da conversão de nódulos persistentes em cânceres e que apenas a vitamina A é capaz de inibir a evolução dos nódulos ou fazer com que regridam.

2. A administração de β -caroteno por intubação gástrica, em dias alternados e por oito semanas consecutivas durante a etapa de progressão da hepatocarcinogênese, resultou em quantidades mensuráveis do carotenóide, mas não em aumentos significantes de retinol, no fígado dos animais submetidos ao modelo do RH. Por outro lado, o tratamento com vitamina A durante esse mesmo período elevou de forma significativa as concentrações de retinol, mas não as do carotenóide, no fígado dos animais submetidos a esse protocolo de carcinogênese hepática. Tais dados sugerem que os efeitos inibitórios do β -caroteno e da vitamina A em nódulos persistentes e cânceres constatados quando de suas administrações na etapa de progressão, podem ser atribuídos em cada caso a aumentos das concentrações hepáticas do carotenóide ou de retinol. Sugerem ainda que o β -caroteno é absorvido em sua forma íntegra, e que este teria uma ação intrínseca que poderia estar diretamente relacionada com sua molécula e ser independente de sua função como pró-vitamina A.

3. Através da determinação do índice de marcação para a bromodesoxiuridina (BrDU) constatou-se que as lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) apresentam maior proliferação de hepatócitos que as áreas teciduais aos seus redores, e que estas demonstram, por sua vez, maior proliferação que tecidos obtidos de fígado de ratos não submetidos ao modelo do RH ou a quaisquer outros tratamentos. Tais dados sugerem que a proliferação celular aumenta à medida que a hepatocarcinogênese evolui.

4. A administração de β -caroteno e de vitamina A reduziu a proliferação de hepatócitos determinada pelo índice de marcação para a BrDU, tanto em lesões hepáticas (nódulos persistentes/cânceres) como nos tecidos a seus redores. Tais dados sugerem que os efeitos inibitórios em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas malignas constatados após aplicação do carotenóide ou do retinóide durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese, podem estar eventualmente relacionados a suas ações inibitórias na proliferação celular.

5. Após digestão com a enzima *Hpa* II dos DNAs extraídos de nódulos persistentes de hepatócitos e de cânceres obtidos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados durante a fase de progressão com óleo de milho, β -caroteno ou vitamina A, e posterior hibridização com as sondas para os proto-oncogenes *c-Ha-ras* e *c-myc*, bem como para o gene que codifica para a enzima HMGC α redutase, observou-se no caso dos três genes padrões de fragmentos de restrição bastante semelhantes tanto nas lesões pré-neoplásicas como neoplásicas malignas. Tais dados sugerem que o padrão de metilação das sequências CCGG desses três genes já havia sido estabelecido em etapas da hepatocarcinogênese anteriores à fase de progressão. Sugerem ainda que variações na metilação dessas sequências não parecem constituir também no caso dos três genes, em um evento que possa contribuir para o estabelecimento da malignidade na carcinogênese hepática.

6. A administração de β -caroteno e de vitamina A da 40ª à 48ª semana após realização do processo de iniciação com o carcinogênico DEN, não alterou o padrão dos fragmentos de restrição observados após digestão com a enzima *Hpa* II dos DNAs extraídos tanto de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas como dos tecidos hepáticos a seus redores obtidos de animais submetidos ao modelo do RH, e subsequente hibridização com as sondas para os genes *c-Ha-ras*, *c-myc* e para a enzima HMGC α redutase. Estes dados sugerem que os efeitos inibitórios em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas constatados quando da administração do carotenóide e do retinóide durante a fase de progressão da hepatocarcinogênese, não parecem estar relacionados a influências que estas substâncias poderiam eventualmente exercer no processo de metilação do DNA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTONEN, L. A., PELTOMÄKI, P., LEACH, F. S., SISTONEN, P., PYLKKÄNEN, L., MECKLIN, J. P. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, v. 260, p. 812-816, 1993.
- ABBOTT, W. A., MEISTER, A. Intrahepatic transport and utilization of biliary glutathione and its metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 83, p. 1246-1250, 1986.
- ABDEL-FATTH, G., WATZL, B., HUANG, D., WATSON, R. R. Beta-carotene in vitro stimulates tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 alpha secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Nutr. Res.*, v. 13, p. 863-871, 1993.
- ACEVEDO, P., BERTRAM, J. Liarozole potentiates the cancer chemopreventive activity and the up-regulation of gap junctional communication and connexin 43 expression by retinoic acid and β -carotene in 10T1/2 cells. *Carcinogenesis*, v. 16, p. 2215-2222, 1995.
- ADAMS, R. L. P. DNA methylation. The Effect of minor bases on DNA-protein interactions. *Biochem. J.*, v. 265, p. 309-320, 1990.
- AGADIR, A., SHEALY, Y. F., HILL, D. L., ZHANG, X. -K. Retinyl methyl ether down-regulates activator protein 1 transcriptional activation in breast cancer cells. *Cancer Res.*, v. 57, p. 3444-3450, 1997.
- AIDOO, A., LYN-COOK, L. E., LENSING, S., WAMER, W. *In vivo* antimutagenic activity of beta-carotene in rat spleen lymphocytes. *Carcinogenesis*, v. 16, p. 2237-2241, 1995.
- AL-ABDULALY, A. B., SIMPSON, K. L. Reversed-phase flash column chromatography for the determination of retinol in some foods. *J. Micronutr. Anal.*, v. 5, p. 161-169, 1989.
- ALAM, B. S., ALAM, S. Q. The effect of different levels of dietary β -carotene on DMBA-induced salivary gland tumors. *Nutr. Cancer*, v. 9, p. 93-101, 1987.
- ALBERTS, D. S., GARCIA, D. J. An overview of clinical cancer chemoprevention studies with emphasis on positive phase III studies. *J. Nutr.*, v. 125, p. 692S-697S, 1995.
- AMES, B. N. Dietary carcinogenesis and anticarcinogens, oxygen radicals, and degenerative diseases. *Science*, v. 221, p. 1256-1264, 1983.
- AMES, B. N., GOLD, L. S. Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 87, p. 7772-7776, 1990.
- AMES, B. N., GOLD, L. S., WILLETT, W. C. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 92, p. 5258-5265, 1995.
- ANILKUMAR, T. V., GOLDING, M., EDWARDS, R. J., LALANI, E. N., SARRAF, C. E., ALISON, M. R. The resistant hepatocyte model of carcinogenesis in the rat: the apparent independent development of oval cell proliferation and early nodules. *Carcinogenesis*, v. 16, p. 845-853, 1995.

- ANZANO, M. A., BYERS, S. W., SMITH, J. M., PEER, C. W., MULLEN, L. T., BROWN, C. C., ROBERTS, A. B., SPORN, M. B. Prevention of breast cancer in the rat with 9-*cis*-retinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen. *Cancer Res.*, v. 54, p. 4614-4617, 1994.
- ANZANO, M. A., PEER, C. W., SMITH, J. M., MULLEN, L. T., SHRADER, M. W., LOGSDON, D. L., DRIVER, C. L., BROWN, C. C., ROBERTS, A. B., SPORN, M. B. Chemoprevention of mammary carcinogenesis in the rat: combined use of raloxifene and 9-*cis*-retinoic acid. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 88, p. 123-125, 1996.
- APPEL, M. J., WOUTERSEN, R. A. Effects of dietary β -carotene and selenium on initiation and promotion of pancreatic carcinogenesis in azaserine-treated rats. *Carcinogenesis*, v. 17, p. 1411-1416, 1996.
- ARMSTRONG, G. A., HEARST, J. E. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.*, v. 10, p. 228-237, 1996.
- ARNOLD, J. T., WILKINSON, B. P., SHARMA, S., STEELE, V. E. Evaluation of chemopreventive agents in different mechanistic classes using a rat tracheal epithelial cell culture transformation assay. *Cancer Res.*, v. 55, p. 537-543, 1995.
- ASTORG, P., GRADELET, S., BERGÉS, R., SUSCHETET, M. No evidence for an inhibitory effect of β -carotene or of canthaxanthin on the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. *Nutr. Cancer*, v. 25, p. 27-34, 1996.
- ASTRÖM, A., TAVAKKOL, A., PETERSSON, U., CROMIE, M., ELDER, J. T., VOORHEES, J. J. Molecular cloning of two cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP). *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 17662-17666, 1991.
- ATHAR, M., AGARWAL, R., WANG, Z. Y., LLOYD, J. R., BICKERS, D. R., MUKHTAR, H. All-*trans* retinoic acid protects against conversion of chemically induced and ultraviolet B radiation-induced skin papillomas to carcinomas. *Carcinogenesis*, v. 12, p. 2325-2329, 1991.
- BABA, M., IISHI, H., YAMAMOTO, R., TATSUTA, M. Inhibition by retinoic acid of hepatocarcinogenesis induced by *N*-nitrosomorpholine and of expression of myc oncogene protein in Sprague-Dawley rats. *Int. J. Cancer*, v. 49, p. 467-470, 1991.
- BAKER, S. J., MARKOWITZ, S., FEARON, E. R., WILSON, J. K. V., VOGELSTEIN, B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, v. 249, p. 912-914, 1990.
- BANNASCH, P. Sequential cellular changes during chemical carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 108, p. 11-22, 1984.
- BANNASCH, P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis*, v. 7, p. 689-695, 1986.
- BANNASCH, P., REISS, W. Histogenese und Cyto-genese cholangiocellulärer Tumoren bei Nitrosomorpholin-vergifteter Ratten. Zugleich ein Beitrag zur Morphogenese der Cystenleber. *Zeit. Krebs*, v. 76, p. 193-215, 1971.
- BANNASCH, P., ZERBAN, H. Tumors of the liver. In: *Pathology of Tumors in Laboratory Animals*. V. S. TURUSOV, U. MOHR, eds. Lyon, IARC Scientific Publications No. 99, v. 1, p. 199-240, 1990.
- BARRETT, J. C. Genetic and epigenetic mechanisms of carcinogenesis. In: *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis*. J. C. BARRETT, ed. Boca Raton, CRC Press Inc., v. 1, p. 1-15, 1987.

- BARRETT, J.C. Mechanisms of action of known human carcinogens. *IARC Sci. Publ.*, v. 116, p. 115-134, 1992.
- BARRETT, J. C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ. Health Perspect.*, v. 100, p. 9-20, 1993.
- BARTH, T. J., ZÖLLER, J., KÜBLER, A., BORN, A., OSSWALD, H. Redifferentiation of oral dysplastic mucosa by the application of the antioxidants beta-carotene, α -tocopherol and vitamin C. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, v. 67, p. 368-376, 1997.
- BARUA, A. B. Retinoyl β -glucuronide: a biologically active form of vitamin A. *Nutr. Rev.*, v. 55, p. 259-267, 1997.
- BASU, T. K., DICKERSON, J. W. T. β -Carotene and related substances. In: *Vitamins in Human Health and Disease*. Wallingford: CAB International, p. 178-192, 1996a.
- BASU, T. K., DICKERSON, J. W. T. Vitamin A. In: *Vitamins in Human Health and Disease*. Wallingford: CAB International, p. 178-192, 1996b.
- BASU, T. K., TEMPLE, N. J., NG, J. Effects of dietary β -carotene on hepatic drug-metabolizing enzymes in mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, v. 3, p. 95-102, 1987.
- BATRES, R. O., OLSON, J. A. A marginal vitamin A status alters the distribution of vitamin A among parenchymal and stellate cells in rat liver. *J. Nutr.*, v. 117, p. 874-879, 1987.
- BAUERNFEIND, J. C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *J. Agr. Food Chem.*, v. 20, p. 456-473, 1972.
- BAUST, C., REDPATH, L., SCHWARZ, E. Different ligand responsiveness of human retinoic acid receptor β gene transcription in tumorigenic and nontumorigenic cervical carcinoma-derived cell lines is mediated through a large retinoic acid response domain. *Int. J. Cancer*, v. 67, p. 409-416, 1996.
- BEEEMS, R. B. The effect of β -carotene on BP-induced respiratory tract tumors in hamsters. *Nutr. Cancer*, v. 10, p. 197-204, 1987.
- BEESON, W. M. Relative potencies of vitamin A and carotene for animals. *Fed. Proc.*, v. 24, p. 924-926, 1965.
- BENDICH, A. The safety of β -carotene. *Nutr. Cancer*, v. 11, p. 207-214, 1988.
- BENDICH, A. Carotenoids and the immune response. *J. Nutr.*, v. 119, p. 112-115, 1989.
- BENDICH, A., OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. *FASEB J.*, v. 3, p. 1927-1932, 1989.
- BENNER, S. Q., HOFMANN, W. J., OTTO, G., PICHLMAYR, R., BANNASCH, P. Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Arch.*, v. 431, p. 391-406, 1997.
- BENNETT, J. *On Cancerous and Cancroid Growths*. Edinburgh: Sutherland and Knox, 1849.
- BENNIS, F., FAVRE, G., LE GAILLARD, F., SOULA, G. Importance of mevalonate-derived products in the control of HMG-CoA reductase activity and growth of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Int. J. Cancer*, v. 55, p. 640-645, 1993.

- BERARD, J., LABOUNE, F., MUKUNA, M., MASSE, S., KOTHARY, R., BRADLEY, W. E. Lung tumors in mice expressing and antisense RAR β 2 transgene. *FASEB J.*, v. 10, p. 1091-1097, 1996.
- BERBERIAN, I., CHEN, L. C., ROBINSON, F. R., GLAUERT, H. P., CHOW, C. K., ROBERTSON, L. W. Effect of dietary retinyl palmitate on the promotion of altered hepatic foci by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in rats initiated with diethylnitrosamine. *Carcinogenesis*, v. 16, p. 393-398, 1995.
- BERENBLUM, I., SHUBIK, P. A new, quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *Br. J. Cancer*, v. 1, p. 383-386, 1947.
- BERTRAM, J. S., KOLONEL, L. N., MEYSKENS JR., F. L. Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans. *Cancer Res.*, v. 47, 3012-3031, 1987.
- BEX, V., MERCIER, T., CHAUMONTET, C., SANCHEZ, J. G., FLECHON, B., MAZET, F., TRAUB, O., MARTEL, P. Retinoic acid enhances connexin 43 expression at the post-transcriptional level in rat liver epithelial cells. *Cell Biochem. Function*, v. 13, p. 69-77, 1995.
- BHAVE, M. R., WILSON, M. J., POIRIER, L. A. c-H-ras and c-K-ras gene hypomethylation in the livers and hepatomas of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis*, v. 9, p. 343-348, 1988.
- BIANCHI-SANTAMARIA, A., DELL'ORTI, M., FRIGOLI, G., GOBBI, M., ARNABOLDI, A., SANTAMARIA, L. Beta-carotene storage in rat organs following carrier mediated supplementation. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, v. 64, p. 15-20, 1994.
- BIESALSKI, H. -K., SCHÄFFER, M. Comparative assessment of the activity of beta-carotene, retinoyl-beta-D-glucuronide and retinoic acid growth and differentiation of a human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, v. 67, p. 357-363, 1997.
- BIRD, A. The essentials of DNA methylation. *Cell*, v. 70, p. 5-8, 1992.
- BISHOP, J. M. The molecular genetics of cancer. *Science*, v. 235, p. 305-311, 1987.
- BISHOP, J. M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, v. 64, p. 235-248, 1991.
- BISHOP, J. M. The discovery of proto-oncogenes. *FASEB J.*, v. 10, p. 362-364, 1996.
- BISSCHOP, A., VAN ROOIJEN, L. A., DERKS, H. J., VAN WIJK, R. Induction of rat hepatic ornithine decarboxylase by the tumor promoters 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and phenobarbital in vivo: effect of retinyl-acetate. *Carcinogenesis*, v. 2, p. 1283-1287, 1981.
- BJELKE, E. Dietary vitamin A and human lung cancer. *Int. J. Cancer*, v. 15, p. 561-565, 1975.
- BLOCK, G., PATTERSON, B., SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, v. 18, p. 1-29, 1992.
- BLOMHOFF, R. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr. Rev.*, v. 52, p. S13-S23, 1994.
- BLOMHOFF, R., WAKE, K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J.*, v. 5, p. 271-277, 1991.

- BLOMHOFF, R., GREEN, M. H., BERG, T., NORUM, K. R. Transport and storage of vitamin A. *Science*, v. 250, p. 399-404, 1990a.
- BLOMHOFF, R., SKREDE, B., NORUM, K. R. Uptake of chylomicron remnant retinyl ester via the low density lipoprotein receptor: implications for the role of vitamin A as a possible preventive for some forms of cancer. *J. Intern. Med.*, v. 228, p. 207-210, 1990b.
- BLOMHOFF, R., GREEN, M. H., GREEN, J. B., BERG, T., NORUM, K. R. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport and storage. *Physiol. Rev.*, v. 71, p. 951-990, 1991.
- BLOT, W. J., LI, J. Y., TAYLOR, P. R., GUO, W., DAWSEY, S., WANG, G. Q., YANG, C. S., ZHENG, S. -F., GAIL, M., LI, G. -Y., YU, Y., LIU, B. -Q., TANGREA, J., SUN, Y. -H., LIU, F., FRAUMENI JR., J. F., ZHANG, Y. -H., LI, B. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combination, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer. Inst.*, v. 85, p. 1483-1491, 1993.
- BOHR, V. A., PHILLIPS, D. H., HANAWALT, P. C. Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome. *Cancer Res.*, v. 54, p. 6426-6436, 1994.
- BOLLAG, W. The retinoid revolution. *FASEB J.*, p. 938-939, 1996.
- BONDI, A., SKLAN, D. Vitamin A and carotene in animal nutrition. *Prog. Food Nutr. Sci.*, v. 8, p. 165-191, 1984.
- BOONE, C. W., KELLOFF, G. J., MALONE, W. E. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Res.*, v. 50, p. 2-9, 1990.
- BOONE, C. W., KELLOFF, G. J., STEELE, V. E. Natural history of intraepithelial neoplasia in humans with implications for cancer chemoprevention strategy. *Cancer Res.*, v. 52, p. 1651-1659, 1992.
- BOREL, P., GROLIER, P., ARMAND, M., PARTIER, A., LAFONT, H., LAIRON, D., AZAIS-BRAESCO, V. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *J. Lipid Res.*, v. 37, p. 250-261, 1996.
- BOS, J. L., VAN KREIJL, C. F. Genes and gene products that regulate cell proliferation and differentiation: critical targets in carcinogenesis. In: *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. H. VAINIO, P. N. MAGEE, D. B. MCGREGOR, A. J. McMICHAEL, eds. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, p. 55-65, 1992.
- BOWEN, P. E., MOBARHAN, S., SMITH, J. C. Carotenoid absorption in humans. *Methods Enzymol.*, v. 214, p. 3-21, 1993.
- BOWEN, P. E., MOBARHAN, S. Evidence from cancer intervention and biomarker studies and the development of biochemical markers. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 62, p. 1403S-1409S, 1995.
- BOYLAN, J. F., LUFKIN, T., ACHKAR, C. C., TANEJA, R., CHAMBON, P., GUDAS, L. J. Target disruption of retinoic acid receptor α (RAR α) and RAR γ results in receptor-specific alterations in retinoic acid-mediated differentiation and retinoic acid metabolism. *Mol. Cell. Biol.*, v. 15, p. 843-851, 1995.
- BRALET, M. P., CALISE, D., BRECHOT, C., FERRY, N. In vivo cell lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis using retroviral-mediated gene transfer. *Lab. Invest.*, v. 74, p. 871-881, 1996.

- BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.*, v. 9, p. 1551-1558, 1995.
- BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-keto-cholesterol. *J. Biol. Chem.*, v. 249, p. 7306-7312, 1974.
- BRUBACHER, G. B., WEISER, H. The vitamin A activity of β -carotene. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, v. 55, p. 5-15, 1985.
- BUKIN, Y. V., ZARIDZE, D. G., DRAUDIN-KRYLENKO, V. A., ORLOV, E. N., SIGACHEVA, N. N. A., DAWEI, F., KURTZMAN, M. Y., SCHLENSKAYA, I. N., GORBACHEVA, O. N., NECHIPAI, A. M., KUVSCHINOV, Y. P., PODDUBNY, B. K., MAXIMOVITCH, D. M. Effect of beta-carotene supplementation on the activity of ornithine decarboxylase (ODC) in stomach mucosa of patients with chronic atrophic gastritis. *Eur. J. Cancer Prev.*, v. 2, p. 61-68, 1993.
- BURDON, R. H. Cell proliferation and oxidative stress: basis for anticancer drugs. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, v. 99B, p. 169-176, 1992.
- BURDON, R. H. Superoxide and hydrogen peroxyde in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 18, p. 775-794, 1995.
- BURDON, R. H., GILL, V. Cellularly generated active oxygen species and HeLa cell proliferation. *Free Radic. Res. Comm.*, v. 19, p. 203-213, 1993.
- BURSCH, W., GRASL-KRAUPP, B., ELLINGER, A., TOROK, L., KIENZL, H., MULLAUER, L., SCHULTE-HERMANN, R. Active cell death: role in hepatocarcinogenesis and subtypes. *Biochem. Cell. Biol.*, v. 72, p. 669-675, 1994.
- BURRI, B. J. Beta-carotene and human health: a review of current research. *Nutr. Res.*, v. 17, p. 547-580, 1997.
- BURTON, K. A. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, v. 62, p. 315-323, 1956.
- BURTON, G. W. Antioxidant actions of carotenoids. *J. Nutr.*, v. 119, p. 109-111, 1989.
- BURTON, G. W., INGOLD, K. U. β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, v. 224, p. 569-573, 1984.
- BUSTROS, A., NELKIN, B. D., SILVERMAN, A., EHRLICH, G., POIESZ, B., BAYLIN, S. B. The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 5693-5697, 1988.
- CAHILL, R. J., O'SULLIVAN, K. R., MATHIAS, P. M., BEATTIE, S., HAMILTON, H., MORAIN, C. O. Effects of vitamin antioxidant supplementation on cell kinetics of patients with adenomatous polyps. *Gut*, v. 34, p. 963-967, 1993.
- CAIRNS, J. The origin of human cancers. *Nature*, v. 289, p. 353-357, 1981.

- CALIARO, M. J., MARMOUGET, C., GUICHARD, S., MAZARS, P., VALETTE, A., MOISAND, A., BUGAT, R., JOZAN, S. Response of four ovarian carcinoma cell lines to all-trans retinoic acid: relationship with induction of differentiation and retinoic acid receptor expression. *Int. J. Cancer*, v. 56, p. 743-748, 1994.
- CAMERON, R. G., ARMSTRONG, D., GUNSEKARA, A., VARGHESE, G., SPEISKY, H. Utilization of circulating glutathione by nodular and cancerous intact rat liver. *Carcinogenesis*, v. 12, p. 2369-2372, 1991.
- CARPENTER, G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 56, p. 881-914, 1987.
- CASEY, G. The role of differentiation in the control of the tumorigenic phenotype. In: *Mechanism of Differentiation*, P. B. FISHER, ed. Boca Raton, FL. CRC, v. 1, p. 89-116, 1991.
- CERDA, S., WEITZMAN, S. A. Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutat. Res.*, v. 386, p. 141-152, 1997.
- CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.*, v. 10, p. 940-954, 1996.
- CHANDLER, L. A., SCHWARTZ, S. J. HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *J. Food Sci.*, v. 52, p. 669-672, 1987.
- CHEN, C. J., YU, M. W., LIAW, Y. F. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 12, p. S294-S308, 1997.
- CHEN, J. Y., PENCO, S., OSTOWSKI, J., BALAGUER, P., PONS, M., STARRETT, J. E., RECZEK, P., CHAMBON, P., GRONEMEYER, H. RAR-specific agonist/antagonist which dissociate transactivation and AP-1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. *EMBO J.*, v. 1187-1197, 1995.
- CHEN, L. -C., SLY, L., JONES, C. S., TARONE, R., DE LUCA, L. M. Differential effects of dietary β -carotene on papilloma and carcinoma formation induced by an initiation-promotion protocol in SENCAR mouse skin. *Carcinogenesis*, v. 14, p. 713-717, 1993.
- CHEN, Z. -Y., CHENG, Y. -H., WHITE, C. C., EATON, D. L. Inhibition of cell proliferation by cyprofibrate in glutathione S-transferase PI-1-positive rat hepatic hyperplastic nodules. *Cancer Res.*, v. 54, p. 2622-2629, 1994.
- CHIN, D. J., GIL, G., RUSSELL, D. W., LISCUM, L., LUSKEY, K. L., BASU, S. K., OKAYAMA, H., BERG, P., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S. Nucleotide sequence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of endoplasmic reticulum. *Nature*, v. 308, p. 613-617, 1984.
- CHOMIENNE, C., FENAUX, P., DEGOS, L. Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB J.*, v. 10, p. 1025-1030, 1996.
- CHURCH, S. L., GRANT, J. W., RIDNOUR, L. A., OBERLEY, L. W., SWANSON, P. E., MELZER, P. S., TRENT, J. M. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, p. 3113-3117, 1993.
- CLEVIDENCE, B. A., BIERI, J. C. Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.*, v. 214, p. 33-46, 1993.

- COHEN, S. M., ELLWEIN, L. B. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science*, v. 249, p. 1007-1011, 1990.
- COHEN, S. M., ELLWEIN, L. B. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 51, p. 6493-6505, 1991.
- COLACCHIO, T. A., MEMOLI, V. A. Chemoprevention of colorectal neoplasms. Ascorbic acid and β -carotene. *Arch. Surg.*, v. 121, p. 1421-1424, 1986.
- COLEMAN, W. B., TSONGALIS, G. J. Multiple mechanisms account for genomic instability and molecular mutation in neoplastic transformation. *Clin. Chem.*, v. 41, p. 644-657, 1995.
- COLUMBANO, A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J. Cell. Biochem.*, v. 58, p. 181-190, 1995.
- COLUMBANO, A., SHINOZUKA, H. Liver regeneration versus direct hyperplasia. *FASEB J.*, v. 10, p. 1118-1128, 1996.
- COLUMBANO, A., RAJALAKSHMI, S., SARMA, D. S. R. Requirement of cell proliferation for the initiation of liver carcinogenesis as assayed by three different procedures. *Cancer Res.*, v. 41, p. 2079-2083, 1981.
- COLUMBANO, A., LEDDA, G. M., RAO, P. M., RAJALAKSHMI, S., SARMA, D. S. R. Dietary orotic acid, a new selective growth stimulus for carcinogen altered hepatocytes in rat. *Cancer Lett.*, v. 16, p. 191-196, 1982.
- COLUMBANO, A., LEDDA-COLUMBANO, G. M., LEE, G., RAJALAKSHMI, S., SARMA, D. S. R. Inability of mitogen-induced liver hyperplasia to support the induction of enzyme-altered islands induced by liver carcinogens. *Cancer Res.*, v. 47, p. 5557-5559, 1987.
- COLUMBANO, A., LEDDA-COLUMBANO, G. M., CURTO, M., ENNAS, G. M., CONI, P., SARMA, D. S. R., PANI, P. Cell proliferation and promotion of rat liver carcinogenesis: different effect of hepatic regeneration and mitogen-induced hyperplasia on the development of enzyme altered foci. *Carcinogenesis*, v. 11, p. 771-776, 1990.
- COMMITTEE ON DIET, NUTRITION AND CANCER; NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Washington D.C.; National Academy Press, p. 478, 1982.
- CONAWAY, C. C., JIAO, D., KELLOFF, G. J., STEELE, V. E., RIVENSON, A., CHUNG, F. L. Chemopreventive potential of fumaric acid, *N*-acetylcysteine, *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide and beta-carotene for tobacco-nitrosamine-induced lung tumors in *A/J* mice. *Cancer Lett.*, v. 124, p. 85-93, 1998.
- CONI, P., PANG, J., PICHIRI-CONI, G., HSU, S., RAO, P. M., RAJALAKSHMI, S., SARMA, D. S. R. Hypomethylation of β -hydroxy- β -methyl-glutaryl coenzyme A reductase gene and its expression during hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*, v. 13, p. 497-499, 1992.
- CONKLIN, G. Cancer and environment. In: *Cancer Biology (Readings from Scientific American)*, E. C. FRIEDBERG, ed. San Francisco, Freeman, p. 19-23, 1949.
- COPELAND, D. H., SALMON, W. D. The occurrence of neoplasms in the liver, lungs and other tissues of rats as a result of prolonged choline deficiency. *Am. J. Pathol.*, v. 22, p. 1059-1079, 1946.

- CORRESPONDENCE RE: E. Farber, cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. *Cancer Res.*, 55: 3759-3762, 1995, *Cancer Res.*, v. 56, p. 4267-4274, 1996.
- COUNTS, J. L., GOODMAN, J. I. Alteration in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell*, v. 83, p. 13-15, 1995.
- CROW, J. A., ONG, D. E. Cell-specific immunohistochemical localization of a cellular retinol-binding protein (type II) in the small intestine of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 4707-4711, 1985.
- CURTHOYS, N. P., HUGHEY, R. P. Characterization and physiological function of rat renal gamma-glutamyltranspeptidase. *Enzyme*, v. 24, p. 383-403, 1979.
- DAGLI, M. L. Z. Aspectos morfológicos dos fígados de ratos tratados com β -caroteno ou vitamina A e submetidos ao modelo do hepatócito resistente de carcinogênese. São Paulo, 167 p. [Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo], 1994.
- DAGLI, M. L. Z., GUERRA, J. L., SINHORINI, I. L., WU, T. -S., RIZZI, M. B. S. L., PENTEADO, M. V. C., MORENO, F. S. β -Carotene reduces the ductular (oval) cell reaction in the liver of Wistar rats submitted to the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. *Pathology*, v. 30, p. 259-266, 1998.
- DAOUD, A. H., GRIFFIN, A. C. Effect of retinoic acid, butylated hydroxytoluene, selenium, and sorbic acid on azo-dye hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.*, v. 8, p. 299-304, 1980.
- DARTIGUES, J. F., DABIS, F., GROS, N., MOISE, A., BOIS, G., SALAMON, R., DILHUYDY, J. M., COURTY, G. Dietary vitamin A, beta-carotene and risk of epidermoid lung cancer in south-western France. *Eur. J. Epidemiol.*, v. 6, p. 261-265, 1990.
- DARWICHE, N., SCITA, G., JONES, C., RUTBERG, S., GREENWALD, E., TENNENBAUM, T., COLLINS, S. J., DE LUCA, L. M., YUSPA, S. H. Loss of retinoic acid receptors in mouse skin and skin tumors is associated with activation of the *ras^{ts}* oncogene and high risk for premalignant progression. *Cancer Res.*, v. 56, p. 4942-4949, 1996.
- DAVIES, B. H. Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. T. W. GOODWIN, ed. Academic Press, London, v. 2, p. 38-165, 1976.
- DAVIES, R. E. Effect of vitamin A on 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced papillomas in rhino mouse skin. *Cancer Res.*, v. 27, p. 237-241, 1967.
- DAWSON, M. I., CHAO, W. R., HELMES, L. T. Inhibition by retinoids of anthralin induced mouse epidermal ornithine decarboxylase activity and anthralin-promoted skin tumor formation. *Cancer Res.*, v. 47, p. 6210-6215, 1987.
- DEJEAN, A., BOUGUELERET, L., GRZESCHIK, K. -H., TIOLLAIS. Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to c-*erb-A* and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature*, v. 322, p. 70-72, 1986.
- DE KLERK, N. H., MUSK, A. W., AMBROSINI, G. L., ECCLES, J. L., HANSEN, J., OLSEN, N., WATTS, V. L., LUND, H. G., PANG, S. C., BEILBY, J., HOBBS, M. S. T. Vitamin A and cancer prevention II: comparison of the effects of retinol and β -carotene. *Int. J. Cancer*, v. 75, p. 362-367, 1998.

- DE LUCA, L. M., SLY, L., JONES, C. S., CHEN, L.-C. Effects of dietary retinoic acid on skin papilloma and carcinoma formation in female SENCAR mice. *Carcinogenesis*, v. 14, p. 539-542, 1993.
- DE LUCA, L. M., DARWICHE, N., CELLI, G., KOSA, K., JONES, C., ROSS, S., CHEN, L.-C. Vitamin A in epithelial differentiation and skin carcinogenesis. *Nutr. Rev.*, v. 52, p. S45-S52, 1994.
- DE LUCA, L. M., KOSA, K., ANDREOLA, F. The role of vitamin A in differentiation and skin carcinogenesis. *J. Nutr. Biochem.*, v. 8, p. 426-437, 1997.
- DE PEE, S., WEST, C. E., MUHILAL, KARYADI, D., HAUTVAST, J. G. A. Lack of improvement in vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. *Lancet*, v. 346, p. 75-81, 1995.
- DE RIDDER, L., MOSSELMANNS, R., BERNAERT, D., GALAND, P. Invasiveness, proliferative activity and ultrastructural phenotypes from diethylnitrosamine-induced neoplastic nodules and hepatocarcinomas *in vitro*. *Int. J. Cancer*, v. 40, p. 664-668, 1987.
- DENDA, A., RAO, P. M., RAJALAKSHMI, S., SARMA, D. S. R. 5-Azacytidine potentiates initiation induced by carcinogens in rat liver. *Carcinogenesis*, v. 6, p. 145-146, 1985.
- DENDA, A., LACONI, E., RAO, P. M., RAJALAKSHMI, S., SARMA, D. S. Sequential histopathological analysis of hepatocarcinogenesis in rats during promotion with orotic acid. *Cancer Lett.*, v. 82, p. 55-64, 1994.
- DEUEL JR., H. J., JOHNSTON, C., SUMNER, E., POLGAR, A., ZECHMEISTER, L. Stereochemical configuration and provitamin A activity. I. All-*trans*-beta-carotene and neo-beta-carotene U. *Arch. Biochem.*, v. 5, p. 107-114, 1944.
- DEW, S. E., ONG, D. E. Specificity of the retinol transporter of the rat small intestine brush border. *Biochemistry*, v. 33, p. 12340-12345, 1994.
- DIEHL, A. M., RAI, R. M. Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J.*, v. 10, p. 215-227, 1996.
- DINGLE, J. T., LUCY, J. A. Vitamin A, carotenoids and cell function. *Biol. Rev.*, v. 40, p. 422-461, 1965.
- DIPPLE, A. DNA adducts of chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 16, p. 437-441, 1995.
- DOERFLER, W. DNA methylation and gene activity. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 52, p. 93-124, 1983.
- DOLBEARE, F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, part II: oncology, chemotherapy and carcinogenesis. *Histochem. J.*, v. 27, p. 923-964, 1995.
- DOLL, R. Strategy for detection of cancer hazards to man. *Nature*, v. 265, p. 589-596, 1977.
- DOLL, R. The lessons of life: Keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res.*, v. 52, p. 2024s-2029s, 1992.
- DOLL, R., PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 66, p. 1191-1308, 1981.

- DOROGOKUPLA, A. C., TROITZKAIA, E. G., ADILGIREIEVA, L. K., POSTOLNIKOV, S. L., CHEKRYGINA, Z. P. Effect of carotene on the development of induced tumors. *Zdravookhr Kazakh*, v. 10, p. 32-34, 1973.
- DOUGLAS, G. R., BLAKEY, D. H., CLAYSON, D. B. Genotoxicity tests as predictors of carcinogens: an analysis. *Mutat. Res.*, v. 196, p. 83-93, 1988.
- DRAGAN, Y. P., PITOT, H. C. The role of the stages of initiation and promotion in phenotypic diversity during hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*, v. 13, p. 739-750, 1992.
- DRAGAN, Y., SARGENT, L., XU, Y. D., XU, Y. H., PITOT, H. The initiation-promotion-progression model of rat hepatocarcinogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 202, p. 16-24, 1993.
- DRAGAN, Y. P., HULLY, J. R., NAKAMURA, J., MASS, M. J., SWENBERG, J. A., PITOT, H. C. Biochemical events during initiation of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 15, p. 1451-1458, 1994a.
- DRAGAN, Y. P., HULLY, J., CROW, R., MASS, M., PITOT, H. C. Incorporation of bromodeoxyuridine in glutathione S-transferase-positive hepatocytes during rat multistage hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 15, p. 1939-1947, 1994b.
- DRAGAN, Y., TEEGUARDEN, J., CAMPBELL, H., HSIA, S., PITOT, H. The quantitation of altered hepatic foci during multistage hepatocarcinogenesis in the rat: transforming growth factor α expression as a marker for the stage of progression. *Cancer Lett.*, v. 93, p. 73-83, 1995.
- DRAGAN, Y. P., CAMPBELL, H. A., XU, X. -H., PITOT, H. C. Quantitative stereological studies of a "selection" protocol of hepatocarcinogenesis following initiation in neonatal male and female rats. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 149-158, 1997.
- DRAGANI, T. A., MANENTI, G., DELLA PORTA, G. Enhancing effect of carbon tetrachloride in mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.*, v. 31, p. 171-179, 1986.
- DRAGSTED, L. O., STRUBE, M., LARSEN, J. C. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 72, p. s116-s135, 1993.
- DRINKWATER, N. R. Experimental models and biological mechanisms for tumor promotion. *Cancer Cells*, v. 2, p. 8-15, 1990.
- DUESTER, G. Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase reductase, aldehyde dehydrogenase and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry*, v. 35, p. 12221-12227, 1996.
- EDES, T. E., THORNTON JR., W. H., SHAH, J. β -Carotene and aryl hydrocarbon hydroxylase in the rat: an effect of β -carotene independent of vitamin A activity. *J. Nutr.*, v. 119, p. 796-799, 1989.
- EDES, T. E., GYSBERS, G. G., BUCKLEY, C. S., THORNTON JR., W. H. Exposure to the carcinogen benzo[a]pyrene depletes tissue vitamin A: β -carotene prevents depletion. *Nutr. Cancer*, v. 15, p. 159-166, 1991.
- EDWARDS, D. R. Cell signalling and the control of gene transcription. *Trends Pharmac. Sci.*, v. 15, p. 239-244, 1994.

- EGNER, P. A., KENSLER, T. W. Effects of superoxide dismutase on complete and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Carcinogenesis*, v. 6, p. 1167-1172, 1985.
- EL-AKAVI, Z., NAPOLI, J. L. Rat liver cytosolic retinal dehydrogenase: comparison of 13-*cis*-, 9-*cis*-, and all-*trans*-retinal as substrates and effects of cellular retinoid-binding proteins and retinoic acid on activity. *Biochemistry*, v. 33, p. 1938-1943, 1994.
- EL-BAYOUMY, K., CHUNG, F. L., RICHIE, J. JR., REDDY, B. S., COHEN, L., WEISBURGER, J., WYNDER, E. L. Dietary control of cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 216, p. 211-223, 1997.
- EL-GORAB, M., UNDERWOOD, B. A. Solubilization of beta-carotene and retinol into aqueous solutions of mixed micelles. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 306, p. 58-66, 1973.
- EL-DEIRY, W. S., NELKIN, B. D., CELANO, P., YEN, R.-W. C., FALCO, J. P., HAMILTON, S. R., BAYLIN, S. B. High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 3470-3474, 1991.
- EMMELOT, P., SCHERER, E. The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. A quantitative approach. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 605, p. 247-304, 1980.
- ENOMOTO, K., FARBER, E. Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 42, p. 2330-2335, 1982.
- EPSTEIN, J. H. Effects of beta-carotene on ultraviolet induced cancer formation in the hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.*, v. 25, p. 211-213, 1973.
- ERDMAN JR., J. W., POOR, C. L., DIETZ, J. M. Factors affecting the bioavailability of vitamin A, carotenoids, and vitamin E. *Food Tech.*, v. 42, p. 214-221, 1988.
- ERDMAN JR., J. W., BIERER, T. L., GUGGER, E. T. Absorption and transport of carotenoids. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 691, p. 76-85, 1993.
- ERLANSON, C., BORGSTOM, B. Identity of vitamin A esterase activity of rat pancreatic juice. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 167, p. 629-631, 1968.
- EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, v. 240, p. 889-895, 1988.
- EVARTS, R. P., NAGY, P., MARSDEN, E., THORGEIRSSON, S. S. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis*, v. 8, p. 1737-1740, 1987.
- FANJUL, A., DAWSON, M. I., HOBBS, P. D., JONG, L., CAMERON, J. F., HARLEY, E., GRAUPNER, G., LU, X. P., PFAHL, M. A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature*, v. 372, p. 107-111, 1994.
- FARBER, E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.*, v. 16, p. 142-148, 1956.
- FARBER, E. The sequential analysis of liver cancer induction. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 605, p. 149-166, 1980.
- FARBER, E. Chemical carcinogenesis. *N. Engl. J. Med.*, v. 305, p. 1379-1389, 1981.

- FARBER, E. The biology of carcinogen-induced hepatocyte nodules and related liver lesions in the rat. *Toxicol. Pathol.*, v. 10, p. 197-201, 1982.
- FARBER, E. Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.*, v. 44, p. 5463-5474, 1984a.
- FARBER, E. Pre-cancerous steps in carcinogenesis: their physiological adaptive nature. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 738, p. 171-180, 1984b.
- FARBER, E. The biochemistry of preneoplastic liver: a common metabolic pattern in hepatocyte nodules. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 62, p. 486-494, 1984c.
- FARBER, E. Clonal adaptation during carcinogenesis. *Biochem. Pharmacol.*, v. 39, p. 1837-1846, 1990.
- FARBER, E. Hepatocyte proliferation in stepwise development of experimental liver cell cancer. *Dig. Dis. Sci.*, v. 36, p. 973-978, 1991.
- FARBER, E. On cells of origin of liver cell cancer. In: *The Role of Cell Types in Hepatocarcinogenesis*. A. E. SÍRICA, ed. Boca Raton, CRC Press, p. 1-28, 1992.
- FARBER, E. Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. *Cancer Res.*, v. 55, p. 3759-3762, 1995.
- FARBER, E., CAMERON, R. The sequential anlysis of cancer development. *Adv. Cancer Res.*, v. 35, p. 125-226, 1980.
- FARBER, E., RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res.*, v. 51, p. 2751-2761, 1991.
- FARBER, E., SARMA, D. S. R. Hepatocarcinogenesis: a dinamic cellular perspective. *Lab. Invest.*, v. 56, p. 4-22, 1987.
- FARBER, E., PARKER, S., GRUENSTEIN, M. The resistance of putative premalignant liver cell populations, hyperplastic nodules, to the acute cytotoxic effects of some hepatocarcinogens. *Cancer Res.*, v. 36, p. 3879-3887, 1976.
- FARBER, E., CHEN, Z. -Y., HARRIS, L., LEE, G., RINAUDO, J. S., ROOMI, W. M., ROTSTEIN, J., SEMPLE, E. The biochemical-molecular pathology of the stepwise development of liver cancer: new insights and problems. In: *Liver Cell Carcinoma. Falk Symposium 51*. P. BANNASCH, D. KEPPLER, G. WEBER, eds. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 273-291, 1988.
- FEARON, E. R., JONES, P. A. Progressing towards a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J.*, v. 6, p. 2783-2790, 1992.
- FEARON, E. R., VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, v. 61, p. 757-767, 1990.
- FEINBERG, A. P., VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, v. 301, p. 89-92, 1983a.

- FEINBERG, A. P., VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, v. 132, p. 6-13, 1983b.
- FEINBERG, A. P., VOGELSTEIN, B. Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, v. 137, p. 266-267, 1984.
- FERNANDES-CARLOS, T., RIONDEL, J., GLISE, D., GUIRAUD, P., FAVIER, A. Modulation of natural killer cell functional activity in athymic mice by beta-carotene, oestrone and their association. *Anticancer Res.*, v. 17, p. 2523-2527, 1997.
- FIALA, S., FIALA, A. E., DIXON, B. Gamma-glutamyl transpeptidase in transplantable, chemically induced rat hepatomas and "spontaneous" mouse hepatomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 48, p. 1393-1401, 1972.
- FIEL, M. I., MIN, A., GERBER, M. A., FAIRE, B., SCHWARTZ, M., THUNG, S. N. Hepatocellular carcinoma in long-term oral contraceptive use. *Liver*, v. 16, p. 372-376, 1996.
- FIORELLA, P. D., NAPOLI, J. L. Microsomal retinoic acid metabolism: effects of cellular retinoic acid-binding protein (type I) and C18-hydroxylation as an initial step. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 10538-10544, 1994.
- FLORIO, W. A. B. Aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos de fígados de ratos tratados com β -caroteno e vitamina A em estágios precoces de carcinogênese, no modelo do hepatócito resistente. São Paulo, 117 p. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo], 1998.
- FISHER, D. E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*, v. 78, p. 539-542, 1994.
- FISHER, G. J., VOORHEES, J. J. Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J.*, v. 10, p. 1002-1013, 1996.
- FORMELLI, F., BARUA, A. B., OLSON, J. A. Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl β -glucuronide. *FASEB J.*, v. 10, p. 1014-1024, 1996.
- FOSTER, J. R. The role of cell proliferation in chemically induced carcinogenesis. *J. Comp. Path.*, v. 116, p. 113-144, 1997.
- FOULDS, L. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res.*, v. 14, p. 327-339, 1954.
- FRANGIONI, J. V., MOGHAL, N., STUART-TILLEY, A., NEEL, B. G., ALPER, S. L. The DNA binding domain of retinoic acid receptor β is required for ligand-dependent suppression of proliferation. *J. Cell Sci.*, v. 107, p. 827-838, 1994.
- FRENKEL, K. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol. Ther.*, v. 53, p. 127-166, 1992.
- FUHRMAN, B., ELIS, A., AVIRAM, M. Hypocholesterolemic effect of lycopene and β -carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 233, p. 658-662, 1997.
- FUJIMAKE, Y. Formation of carcinoma in albino rats fed on deficient diets. *J. Cancer Res.*, v. 10, p. 469-477, 1926.

- FURR, H. C., CLARK, R. M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *J. Nutr. Biochem.*, v. 8, p. 364-377, 1997.
- GAD, M. Z., HARRISON, E. H. Neutral and acid retinyl ester hydrolases associated with rat liver microsomes: relationships to microsomal cholesteryl ester hydrolases. *J. Lip. Res.*, v. 32, p. 685-693, 1991.
- GAD, S. C., WEIL, C. S. Statistics for toxicologists. In: *Principles and Methods of Toxicology*. A. W. HAYES, ed. Raven Press, New York, p. 435-483, 1989.
- GAMA-SOZA, M., SLAGEL, V. A., TREWYN, R. W., OXENHANDLER, R., KUO, K. C., GEHRKE, C. W., EHRLICH, M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.*, v. 11, p. 6883-6894, 1983.
- GANGULY, J., SASTRY, P. S. Mechanism of conversion of β -carotene into vitamin A - Central cleavage versus random cleavage. *World Rev. Nutr. Diet.*, v. 45, p. 199-220, 1985.
- GARCEA, R., DAINO, L., PASCALE, R., SIMILE, M. M., PUDDU, M., FRASSETTO, S., COZZOLINO, P., SEDDAIU, M. A., GASPA, L., FEO, F. Inhibition of promotion and persistent nodule growth by S-adenosyl-L-methionine in rat liver carcinogenesis: role of remodeling and apoptosis. *Cancer Res.*, v. 49, p. 1850-1856, 1989a.
- GARCEA, R., DAINO, L., PASCALE, R., SIMILE, M. M., PUDDU, M., RUGGIU, M. E., SEDDAIU, M. A., SATTA, G., SEQUENZA, M. J., FEO, F. Protooncogene methylation and expression in regenerating liver and preneoplastic liver nodules induced in the rat by diethylnitrosamine: effect of variations of S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio. *Carcinogenesis*, v. 10, p. 1183-1192, 1989b.
- GAREWAL, H. S. Antioxidants in oral cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 62, p. 1410S-1416S, 1995.
- GAZIANO, J. M., JOHNSON, E. J., RUSSELL, R. M., MANSON, J. E., STAMPFER, M. J., RIDKER, P. M., FREI, B., HENNEKENS, C. H., KRINSKY, N. I. Discrimination in absorption or transport of β -carotene isomers after oral supplementation with either all-trans- or 9-cis- β -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 61, p. 1248-1252, 1995.
- GEISEN, C., DENK, C., GREMM, B., BAUST, C., KARGER, A., BOLLAG, W., SCHWARZ, E. High-level expression of the retinoic acid receptor β gene expression in normal cells of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor α and is abnormally down-regulated in cervical carcinoma cells. *Cancer Res.*, v. 57, p. 1460-1467, 1997.
- GERADTS, J., CHEN, J. -Y., RUSSELL, E. K., YANKASKAS, J. R., NIEVES, L., MINNA, J. D. Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. *Cell Growth & Differ.*, v. 4, p. 799-809, 1993.
- GERMAIN, L., NOEL, M., GOURDEAU, H., MARCEAU, N. Promotion of growth and differentiation of rat ductular oval cells in primary culture. *Cancer Res.*, v. 48, p. 368-378, 1988.
- GERSTER, H. Potential role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, v. 61, p. 277-291, 1991.
- GERSTER, H. Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, v. 63, p. 93-121, 1993.

- GERSTER, H. β -Carotene, vitamin E and vitamin C in different stages of experimental carcinogenesis. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 49, p. 155-168, 1995.
- GERSTER, H. Intermediate cancer biomarkers and their use in beta-carotene studies in humans. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, v. 66, p. 3-18, 1996.
- GERSTER, H. The potential role of lycopene for human health. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 16, p. 109-126, 1997a.
- GERSTER, H. Vitamin A - Functions, dietary requirements and safety in humans. *Internat. J. Vitam. Nutr. Res.*, v. 67, p. 71-90, 1997b.
- GESCHER, A., PASTORINO, U., PLUMMER, S. M., MANSON, M. M. Suppression of tumor development by substances derived from the diet- mechanisms and clinical implications. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 45, p. 1-12, 1998.
- GHOSHAL, A. K., FARBER, E. The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Carcinogenesis*, v. 5, p. 1367-1370, 1984.
- GIARDELLO, F. M., HAMILTON, S. R., KRUSH, A. J., PIAANTODOSI, S., HYLIND, L. M., CELANO, P., BOOKER, S. V., ROBINSON, R. C., OFFERHAUS, G. J. A. Treatment of colonic rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.*, v. 328, p. 1313-1316, 1993.
- GLOVER, J. The conversion of β -carotene into vitamin A. *Vitam. Horm.*, v. 18, p. 371-386, 1960.
- GODOY, H. T., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of cis-isomers of provitamin A in brazilian fruits. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 1306-1313, 1994.
- GOETHEM, F. V., GHAHROUDI, M. A., CASTELAIN, P., KIRSCH-VOLDERS, M. Frequency and DNA content of micronuclei in rat parenchymal liver cells during experimental hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 14, p. 2397-2406, 1993.
- GOODMAN, D. S. Overview of current knowledge of metabolism of vitamin A and carotenoids. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 73, p. 1375-1379, 1984.
- GOODMAN, D. S., HUANG, H. S. Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes. *Science*, v. 149, p. 879-880, 1965.
- GOODMAN, D. S., BLOMSTRAND, R., WERNER, B., HUANG, H. S., SHIRATORI, T. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and β -carotene in man. *J. Clin. Invest.*, v. 45, p. 1615-1623, 1966.
- GRADELET, S., ASTORG, P., LE BON, A. -M., BERGÈS, R., SUSCHETET, M. Modulation of aflatoxin B₁ carcinogenicity, genotoxicity and metabolism in rat liver by dietary carotenoids: evidence for a protective effect of CYP1A inducers. *Cancer Lett.*, v. 114, p. 221-223, 1997.
- GRADELET, S., LE BON, A. -M., BERGÈS, R., SUSCHETET, M., ASTORG, P. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B₁-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B₁ metabolism. *Carcinogenesis*, v. 19, p. 403-411, 1998.

- GRASL-KRAUPP, B., BURSCH, W., RUTTKAY-NEDECKY, B., WAGNER, A., LAUER, B., SHULTE-HERRMANN, R. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p. 9995-9999, 1994.
- GREEN, S., WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: finding the orphan a home. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 100, p. 149-153., 1994.
- GREENBERG, E. R., BARON, J. A., STUKEL, T. A., STEVENS, M. M., MANDEL, J. S., SPENCER, S. K., ELIAS, P. M., LOWE, N., NIERENBERG, D. W., BAYRD, G., VANCE, J. C., FREEMAN, D. H. JR., CLENDENNING, W. E., KWAN, T. and the Skin Cancer Prevention Study Group. A clinical trial of beta-carotene to prevent basal-cell and squamous-cell cancers of the skin. *New Engl. J. Med.*, v. 323, p. 789-795, 1990.
- GREENBLATT, M. S., BENNETT, W. P., HOLLSTEIN, M., HARRIS, C. C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, v. 54, p. 4855-4878, 1994.
- GREENWALD, E. D., GREENWALD, E. S. *Cancer Epidemiology*. Medical Examination Publ. New Hyde Park, New York, 1983.
- GRISHAM, J. W., HARTROF, W. S. Morphologic identification by electron microscopy of oval cells in experimental hepatic degeneration. *Lab. Invest.*, v. 10, p. 317-332, 1961.
- GROSS, M. D., BISHOP, T. D., BELCHER, J. D., JACOBS JR., D. R. Induction of HL-60 cell differentiation by carotenoids. *Nutr. Cancer*, v. 27, p. 169-173, 1997.
- GUDAS, L. J. Retinoids, retinoid-response genes, cell differentiation and cancer. *Cell Growth Differ.*, v. 3, p. 655-662, 1992.
- GUDAS, L. J. Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 15399-15402, 1994.
- GUDAS, L. J., SPORN, M. B., ROBERTS, A. B. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: *The Retinoids, Biology, Chemistry, and Medicine*. M. B. SPORN, A. B. ROBERTS, D. S. GOODMAN, eds. Raven Press Ltd., New York, p. 443-520, 1994.
- HAENSZEL, W., KURIHARA, M. Studies of Japanese Migrants. I Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 40, p. 43-68, 1968.
- HAENSZEL, W., KURIHARA, M., SEGI, M., LEE, R. K. C. Stomach cancer among Japanese in Hawaii. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 49, p. 969-988, 1972.
- HANIGAN, M. H., PITOT, H. C. Gamma-glutamyl transpeptidase — its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 6, p. 165-172, 1985.
- HANSEN, S., MARET, W. Retinal is not formed *in vitro* by enzymatic central cleavage of β -carotene. *Biochemistry*, v. 27, p. 200-206, 1988.
- HAYSTEAD, T. A. J., SIM, A. T. R., CARLING, D., HONNOR, R. C., TSUKITANI, Y., COHEN, P., HARDLE, D. G. Effects of the tumor promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature*, v. 337, p. 78-81, 1989.

- HAZELWOOD, R. N. Carcinogen risk assessment. *Adv. Food Res.*, v. 31, p. 1-51, 1987.
- HAZUKA, M. B., EDWARDS-PRASAD, J., NEWMAN, I., KINZLE, J. J., PRASAD, K. N. Beta-carotene induces morphological differentiation and decreases adenylate cyclase activity in melanoma cells in culture. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 9, p. 143-149, 1990.
- HE, Y., ROOT, M. M., PARKER, R. S., COLIN CAMPBELL, T. Effects of carotenoid-rich food extracts on the development of preneoplastic lesions in rat liver and on *in vivo* and *in vitro* antioxidant status. *Nutr. Cancer*, v. 27, p. 238-244, 1997.
- HEBUTERNE, X., WANG, X. -D., JOHNSON, E. J., KRINSKY, N. I., RUSSELL, R. M. Intestinal absorption and metabolism of 9-cis- β -carotene in vivo: biosynthesis of 9-cis-retinoic acid. *J. Lipid Res.*, v. 36, p. 1264-1273, 1995.
- HELGERUD, P., PETERSEN, L. B., NORUM, K. R. Retinol esterification by microsomes from the mucosa of human small intestine. Evidence for acyl-coenzyme A retinol acyltransferase activity. *J. Clin. Invest.*, v. 71, p. 747-753, 1983.
- HENDERSON, B. E., ROSS, R. K., PIKE, M. C. Toward the primary prevention of cancer. *Science*, v. 254, p. 1131-1138, 1991.
- HENDRICH, S., PITOT, H. C. Enzymes of glutathione metabolism as biochemical markers during hepatocarcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 6, p. 155-178, 1987.
- HENDRIKS, H. F. J. Retinoid (vitamin A) metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 50, p. S2-S6, 1996.
- HENNEKENS, C. H., BURING, J. E., MANSON, J. E., STAMPFER, M. ROSNER, B., COOK, N. R., BELANGER, C., LaMOTTE, F., GAZIANO, J. M., RIDKER, P. M., WILLETT, W., PETO, R. Lack of effect of long-term supplementation with beta-carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 334, p. 1145-1149, 1996.
- HENNINGS, H., SHORES, R., WENK, M. L., SPANGLER, E. F., TARONE, R., YUSPA, S. H. Malignant conversion of mouse skin tumors is increased by tumour initiators and unaffected by tumour promoters. *Nature*, v. 304, p. 67-69, 1983.
- HENNINGS, H., SHORES, R., MITCHELL, P., SPANGLER, E. F., YUSPA, S. H. Induction of papillomas with a high probability of conversion to malignancy. *Carcinogenesis*, v. 6, p. 1607-1610, 1985.
- HIGGINS, G. M., ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.*, v. 12, p. 186-202, 1931.
- HIGGINSON, J., MUIR, C. S. Epidemiology. In: *Cancer Medicine*. J. F. HOLLAND, E. FREI, eds. Philadelphia, Lea & Febiger, 1973.
- HILL, J. *Cautions Against the Immoderate Use of Snuff*. London, Baldwin & Jackson, p. 30, 1761.
- HOLLANDER, D., RUBLE JR., P. E. β -Carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. *Am. J. Physiol.*, v. 235, p. E686-E691, 1978.

- HONG, W. K., ITRI, L. M. Retinoids and human cancer. In: *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. M. B. SPORN, A. B. ROBERTS, D. S. GOODMAN, eds. Raven Press Ltd., New York, 2nd. ed., p. 597-630, 1994.
- HONG, W. K., SPORN, M. B. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science*, v. 278, p. 1073-1077, 1997.
- HORIUCHI, S., INOUE, M., MORINO, Y. Gamma-glutamyl transpeptidase: sidedness of its active site on renal brush border membrane. *Eur. J. Biochem.*, v. 87, p. 429-437, 1978.
- HOSSAIN, M. Z., ZHANG, L. -X., BERTRAM, J. S. Retinoids and carotenoids upregulate gap-junctional communication: correlation with enhanced growth control and cancer prevention. *Progr. Cell Res.*, v. 3, p. 301-309, 1993.
- HOULE, B., ROCHETTE-EGLY, C., BRADLEY, W. E. C. Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor β in human epidermoid lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, p. 985-989, 1993.
- HOWE, J. A., MYMRYK, J. S., EGAN, C., BRANTON, P. E., BAYLEY, S. T. Retinoblastoma growth suppressor and a 300kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 87, p. 5883-5887, 1990.
- HSIA, C. C., THORGEIRSSON, S. S., TABOR, E. Expression of hepatitis B surface and core antigens and transforming growth factor- α in "oval cells" of the liver in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Med. Virol.*, v. 43, p. 216-221, 1994.
- HSU, S. -M., RAINE, L., FANGER, H. A. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 75, p. 734-738, 1981.
- HU, L., CROWE, D. L., RHEINWALD, J. G., CHAMBON, P., GUDAS, L. J. Abnormal expression of retinoic acid receptors and keratin 19 by human oral and epidermal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, v. 51, p. 3972-3981, 1991.
- HUANG, H. S., GOODMAN, D. S. Vitamin A and carotenoids. I. Intestinal absorption and metabolism of ^{14}C -labeled vitamin A alcohol and β -carotene in the rat. *J. Biol. Chem.*, v. 240, p. 2839-2844, 1965.
- HUANG, M. E., YE, Y. I., CHEN, S. R., CHAI, J. R., LU, J. X., ZHOA, L., GU, L. J., WANG, Z. Y. Use of all-trans-retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, v. 72, p. 567-572, 1988.
- HUEBNER, R. J., TODARO, G. J. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 64, p. 1087-1094, 1969.
- HUFF, J. Issues and controversies surrounding qualitative strategies for identifying and forecasting cancer causing agents in the human environment. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 72, p. s12-s27, 1993.
- HUGHES, D. A., WRIGHT, A. J., FINGLAS, P. M., PEERLESS, A. C., BAILEY, A. L., ASTLEY, S. B., PINDER, A. C., SOUTHON, S. The effect of beta-carotene supplementation on the immune function of blood monocytes from healthy male nonsmokers. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 129, p. 309-317, 1997.
- HUNTER, T. Oncoprotein networks. *Cell*, v. 88, p. 333-346, 1997.

- HUNTER, T., PINES, J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, v. 79, p. 573-582, 1994.
- IMAI, T., MASUI, T., ICHINOSE, M., NAKANISHI, H., YANAI, T., MASECI, T., MURAMATSU, M., TATEMATSU, M. Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by *in situ* hybridization. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 545-551, 1997.
- IRVING, C. C. Comparative toxicity of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in several strains of rats. *Cancer Res.*, v. 35, p. 2959-2961, 1975.
- IUPAC-IUB JOINT COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE. Nomenclature of retinoids. Recommendations 1981. *Eur. J. Biochem.*, v. 129, p. 1-5, 1982.
- IWAI, M., KASHIWADANI, M., KITAGAWA, Y., KASHIMA, K., IBATA, Y., YASUDA, K. Immunocytochemical investigation of rat gamma-glutamyl transpeptidase in chemically-induced hepatocarcinogenesis using monoclonal antibody. *Arch. Histol. Cytol.*, v. 57, p. 119-127, 1994.
- IYAMA, T., TAKASUGA, A., AZUMA, M. β -Carotene accumulation in mouse tissues and a protective role against lipid peroxidation. *Internat. J. Vitam. Nutr. Res.*, v. 66, p. 301-305, 1996.
- JACOBS, T. Control of the cell cycle. *Dev. Biol.*, v. 153, p. 1-15, 1992.
- JARROUS, N., KAEMPFER, R. Induction of human interleukin-1 gene expression by retinoic acid and its regulation at processing of precursor transcripts. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 23141-23149, 1994.
- JENSEN, C. D., HOWES, T. W., SPILLER, G. A., PATTISON, T. S., WHITTAM, J. H., SCALA, J. Observations on the effects of ingesting *cis*- and *trans*-beta carotene isomers on human serum concentration. *Nutr. Rep. Int.*, v. 35, p. 413-422, 1987.
- JETTEN, A. M. Modulation of cell growth by retinoids and their possible mechanisms of action. *Fed. Proc.*, v. 43, p. 134-139, 1984.
- JIANG, G., SLADEK, F. M. The DNA binding of hepatocyte nuclear factor 4 mediates cooperative, specific binding to DNA and heterodimerization with the retinoid X receptor α . *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 1218-1225, 1997.
- JONES, P. A. Role of DNA methylation in regulating gene expression, differentiation, and carcinogenesis. In: *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis. Role of Genetic and Epigenetic Changes*. J. C. BARRETT, ed. CRC Press Inc., Boca Raton, vol. I, p. 17-29, 1987.
- JONES, P. A. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res.*, v. 56, p. 2463-2467, 1996.
- JONES, P. A., TAYLOR, S. M., MOHANDAS, T., SHAPIRO, L. J. Cell cycle specific reactivation of an inactive X-chromosome locus by 5-azadeoxycytidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 7586-7590, 1982.
- JONES, R. C., SUGIE, S., BRALEY, J., WEISBURGER, J. H. Dietary β -carotene in rat models of gastrointestinal cancer. *J. Nutr.*, v. 119, p. 508-514, 1989.
- JUNQUEIRA, L. C. U., JUNQUEIRA, L. M. M. S. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. Ed. Santos, São Paulo, 1983.

- JYOTHIRMAYI, R., RAMADAS, K., VARGHESE, C., JACOB, R., NAIR, M. K., SANKARANARAYANAN, R. Efficacy of vitamina A in the prevention of loco-regional recurrence and second primaries in head and neck cancer. *Eur. J. Cancer B Oral Oncol.*, v. 32B, p. 373-376, 1996.
- KAGAWA, Y. Impact of westernization on the nutrition of Japanese: changes in physique, cancer, longevity and centenarians. *Prev. Med.*, v. 7, p. 205-217, 1978.
- KAHL-RAINER, P., MARIAN, B. Retinoids inhibit protein kinase C-dependent transduction of 1,2-diglyceride signals in human colonic tumor cells. *Nutr. Cancer*, v. 21, p. 157-168, 1994.
- KALENGAYI, M. M., RONCHI, G., DESMET, V. J. Histochemistry of gamma-glutamyltranspeptidase in rat liver during aflatoxin B1 induced carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 55, p. 579-588, 1975.
- KANDUC, D., ROSSIELLO, M. R., ARESTA, A., CAVAZZA, C., QUAGLIARIELLO, E., FARBER, E. Transitory DNA hypomethylation during liver cell proliferation induced by a single dose of lead nitrate. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 286, p. 212-216, 1991.
- KARNAUKHOV, V. N. Carotenoids: recent progress, problems and prospects. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 95B, p. 1-20, 1990.
- KARRER, P., HELFENSTEIN, A., WEHRLI, H., WETTSTEIN, A. Pflanzenfarbstoffe XXV. Über die konstitution des lycopin und carotins. *Helv. Chim. Acta*, v. 13, p. 1084-1099, 1930.
- KARRER, P., MORF, R., SCHOEPP, K. Zur Kenntnis des Vitamins A in Fischtranen. *Helv. Chim. Acta*, v. 14, p. 1431-1436, 1931.
- KASTNER, P., CHAMBON, P., LEID, M. Role of nuclear retinoic acid receptors in the regulation of gene expression. In: *Vitamin A in Health and Disease*, R. BLOMHOFF, ed. Marcel Dekker, New York, p. 189-238, 1994.
- KATSUMURA, N., OKUNO, M., ONOGI, N., MARIWAKI, H., MUTO, Y., KOJIMA, S. Suppression of mouse skin papilloma by canthaxanthin and β -carotene *in vivo*: possibility of the regression of tumorigenesis by carotenoids without conversion to retinoic acid. *Nutr. Cancer*, v. 26, p. 203-208, 1996.
- KAZI, N., RADVANY, R., OLDHAM, T., KESHAVARZIAN, A., FROMMEL, T. O., LIBERTIN, C., MOBARHAN, S. Immunomodulatory effect of β -carotene on T lymphocyte subsets in patients with resected colonic polyps and cancer. *Nutr. Cancer*, v. 28, p. 140-145, 1997.
- KELLOFF, G. J., MALONE, W. F., BOONE, C. W., STEELE, V. E., DOODY, L. A. Intermediate biomarkers of precancer and their application in chemoprevention. *J. Cell. Biochem.*, v. 16G, p. 15-21, 1992.
- KELLOFF, G. J., BOONE, C. W., STEELE, V. E., CROWELL, J. A., LUBET, R. A., GREENWALD, P., HAWK, E. T., FAY, J. R., SIGMAN, C. C. Mechanistic considerations in the evaluation of chemopreventive data. *IARC Sci. Publ.*, v. 139, p. 203-219, 1996.
- KENNAWAY, E. L., HEIGER, I. Carcinogenic substances and their fluorescence spectra. *Br. Med. J.*, v. 1, p. 1044-1046, 1930.

- KEW, M. C., YU, M. C., KEDDA, M. A., COPPIN, A., SARKIN, A., HODKINSON, J. The relative roles of hepatitis B and C viruses in the etiology of hepatocellular carcinoma in southern African blacks. *Gastroenterology*, v. 112, p. 184-187, 1997.
- KHACHIK, F., BEECHER, G. R., LUSBY, W. R. Separation, identification, and quantification of the major carotenoids in extracts of apricots, peaches, cantaloupe, and pink grapefruit by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, v. 37, p. 1465-1473, 1989.
- KHACHIK, F., BEECHER, G. R., GOLI, M. G. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure Appl. Chem.*, v. 63, p. 71-80, 1991.
- KHACHIK, F., BEECHER, G. R., SMITH JR., J. C. Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J Cell Biochem. Suppl.*, v. 22, p. 236-246, 1995.
- KHACHIK, F., SPANGLER, C. J., SMITH Jr., J. C., CANFIELD, L. M., STECK, A., PFANDER, H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal. Chem.*, v. 69, p. 1873-1881, 1997.
- KIRFEL, J., KELTER, M., CANCELA, L. M., PRICE, P. A., SCHÜLE, R. Identification of a novel negative retinoic acid responsive element in the promoter of the human matrix Gla protein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 2227-2232, 1997.
- KITAGAWA, T. Histochemical analysis of hyperplastic lesions and hepatomas of the liver of rats fed N-2-fluorenylacetamide. *Gann*, v. 62, p. 207-216, 1971.
- KITAGAWA, T., PITOT, H. C. The regulation of serine dehydratase and glucose-6-phosphatase in hyperplastic nodules of rat liver during diethylnitrosamine and N-2-fluorenylacetamide feeding. *Cancer Res.*, v. 35, p. 1075-1084, 1975.
- KLEIN, G. The approaching era of the tumor suppressor genes. *Science*, v. 238, p. 1539-1545, 1987.
- KOO, L. C. Diet and lung cancer 20 + years later: more questions than answers? *Int. J. Cancer*, v. 10S, p. 22-29, 1997.
- KRAUPP-GRASL, B., HUBER, W., PUTZ, B., GERBRACHT, U., SCHULTE-HERMANN. Tumor promotion by the peroxisome proliferator nafenopin involving a specific subtype of altered foci in rat liver. *Cancer Res.*, v. 50, p. 3701-3708, 1990.
- KRINSKY, N. I. Beta-carotene: functions. In: *New Protective Roles for Selected Nutrients*. Alan R. Liss, Inc., p. 1-15, 1989a.
- KRINSKI, N. I. Carotenoids and cancer in animal models. *J. Nutr.*, v. 119, 123-126, 1989b.
- KRINSKY, N. I. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 53, p. 238S-246S, 1991.
- KRINSKY, N. I. Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation. *Ann. New York Acad. Sci.*, v. 686, p. 229-242, 1993.

- KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. *Pure & Appl. Chem.*, v. 66, p. 1003-1010, 1994.
- KRINSKY, N. I., MATHEWS-ROTH, M. M., WELANKIWAR, S., SEHGAL, P. K., LAUSEN, N. C. G., RUSSETT, M. The metabolism of [^{14}C] β -carotene and the presence of other carotenoids in rats and monkeys. *J. Nutr.*, v. 120, p. 81-87, 1990.
- KRUTOVSKIKH, V. A., MESNIL, M., MAZZOLENI, G., YAMASAKI, H. Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents *in vivo*. *Lab. Invest.*, v. 72, p. 571-577, 1995.
- LAIRD, P. W., JAENISCH, R. DNA methylation and cancer. *Hum. Mol. Genet.*, v. 3, p. 1487-1495, 1994.
- LAKSHMAN, M. R., MYCHKOVSKY, I., ATTLESEY, M. Enzymatic conversion of all-trans- β -carotene to retinal by a cytosolic enzyme from rabbit and rat intestinal mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, p. 9124-9128, 1989.
- LAMBE, W. *Additional Reports on the Effects of a Peculiar Regimen in Cases of Cancer, Scrofula, Consumption, Asthma, and other Chronic Diseases*. London: Mawman, 1815.
- LAMBERT, L. A., WAMER, W. G., WEI, R. R., LAVU, S., CHIRTEL, S. J., KORNHAUSER, A. The protective but nonsynergistic effect of dietary β -carotene and vitamin E on skin tumorigenesis in Skh mice. *Nutr. Cancer*, v. 21, p. 1-12, 1994.
- LAMM, D. L., RIGGS, D. R., SHRIVER, J. S., VANGILDER, P. F., RACH, J. F., DEHAVEN, J. I. Megadose vitamins in bladder cancer: a double-blind clinical trial. *J. Urol.*, v. 151, p. 21-26, 1994.
- LANE, D. P. A death in the life of p53. *Nature*, v. 362, p. 786-787, 1993.
- LAWLEY, P. D. Historical origins of current concepts of carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.*, v. 65, p. 17-111, 1994.
- LE MARCHAND, L., YOSHIKAWA, C. N., KOLONEL, L. N., HANKIN, J. H., GOODMAN, M. T. Vegetable consumption and lung cancer risk: a population-based case-control study in Hawaii. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 81, p. 1158-1164, 1989.
- LEDDA-COLUMBANO, G. M., CONI, P., CURTO, M., GIACOMINI, L., FAA, G., SARMA, D. S. R., COLUMBANO, A. Mitogen-induced liver hiperplasia does not substitute for compensatory regeneration during promotion of chemical hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 13, p. 379-383, 1992.
- LETTINGA, K. D., GUTTER, W., VANNOORDEN, C. J. F., SCHELLENS, J. P. M., FREDERIKS, W. M. Early effects of high doses of retinol (vitamin A) on the *in situ* cellular metabolism in rat liver. *Liver*, v. 16, p. 1-11, 1996.
- LETEURTRE, F., KOHLHAGEN, G., FESEN, M. R., TANIZAWA, A., KOHN, K. W., POMMIER, Y. Effects of DNA methylation on topoisomerase I and II cleavage activities. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 7893-7900, 1994.
- LEVIN, G., AMOTZ, A. B., MOKADY, S. Liver accumulation of soluble all-trans or 9-cis β -carotene in rats and chicks. *Com. Biochem. Physiol.*, v. 107A, p. 203-207, 1994.

- LEVINE, N., MOON, T. E., CARTMEL, B., BANGERT, J. L., RODNEY, S., DONG, Q., PENG, Y. M., ALBERTS, D. S. Trials of retinol and isotretinoin in skin cancer prevention: a randomized, double-blind, controlled trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 6., p. 957-961, 1997.
- LEWIS, J., BIRD, A. DNA methylation and chromatin structure. *FEBS Lett.*, v. 285, p. 155-159, 1991.
- LEWIS, K. C., GREEN, M. H., GREEN, J. B., ZECH, L. A. Retinol metabolism in rats with low vitamin A status: a compartmental model. *J. Lipid Res.*, v. 31, p. 1535-1548, 1990.
- LI, J. J., DONG, Z. G., DAWSON, M. I., COLBURN, N. H. Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Res.*, v. 56, p. 483-489, 1996.
- LI, J. -Y., TAYLOR, P. R., LI, B., DAWSEY, S., WANG, G. -Q., ERSHOW, A. G., GUO, W., LIU, S. -F., YANG, C. S., SHEN, Q., WANG, W., MARK, S. D., ZOU, X. -N., GREENWALD, P., WU, Y. -P., BLOT, W. J. Nutrition intervention trials in Linxian, China: multiple vitamin/mineral supplementation,, cancer incidence, and disease-specific mortality among adults with esophageal dysplasia. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 85, p. 1492-1498, 1993.
- LIANG, F., JASIN, M. Studies on the influence of cytosine methylation on DNA recombination and end-joining in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 23838-23844, 1995.
- LINDROOS, P. M., ZARNEGAR, R., MICHALOPOULOS, G. K. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology*, v. 13, p. 743-750, 1990.
- LIPPMAN, S. M., HEYMAN, R. A., KURIE, J. M., BENNER, S. E., HONG, W. K. Retinoids and chemoprevention: clinical and basic studies. *J. Cell. Biochem.*, v. 22, p. 1S-10S, 1995.
- LIU, Y., LEE, M -O., WANG, H. -G., LI, Y., HASHIMOTO, Y., KLAUS, M., REED, J.C., ZHANG, X. -K. RAR β mediates the growth inhibitory effect of retinoic acid by inducing cell apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, v. 16, p. 1138-1149, 1996.
- LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., DARNELL, J. *Cancer. Molecular Cell Biology*. New York, Scientific American Books, 3d ed., p. 1247-1294, 1995.
- LOEB, L. A. Endogenous carcinogenesis: molecular oncology into the twenty-first century - presidential address. *Cancer Res.*, v. 49, p. 5489-5496, 1989.
- LOEB, L. A. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.*, v. 54, p. 5059-5063, 1994.
- LOTAN, R. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.*, v. 10, p. 1031-1039, 1996.
- LOTAN, R., XU, X. -C., LIPPMAN, S. M., RO, J. Y., LEE, J. S., HONG, W. K. Suppression of retinoic acid receptor- β in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N. Engl. J. Med.*, v. 332, p. 1405-1410, 1995.

- LÖWESTEIN, W. R., ROSE, B. The cell-cell channel in the control of growth. *Semin. Cell Biol.*, v. 3, p. 59-79, 1992.
- LUPULESCU, A. Inhibition of DNA synthesis and neoplastic growth by vitamin A (retinol). *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 77, p. 149-156, 1986.
- LUPULESCU, A. The role of vitamins A, β -caroteno, E and C in cancer biology. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, v. 63, p. 3-14, 1993.
- LYU, Y. -W., CHANG, K. -J., LIU, Y. -C. DNA methylation is not involved in growth regulation of gene expression of proliferating cell nuclear antigen. *Exp. Cell Res.*, v. 208, p. 479-484, 1993.
- MACDONALD, P. N., ONG, D. E. Binding specificities of cellular retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein, type II. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 10550-10556, 1987.
- MACDONALD, P. N., ONG, D. E. Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 12478-12482, 1988.
- MACK, D. O., REED, V. L., SMITH, L. D. Retinyl acetate inhibition of 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene induced hepatic neoplasia. *Int. J. Biochem.*, v. 22, p. 359-365, 1990.
- MACLENNAN, R., DA COSTA, J., DAY, N. E., LAW, C. H., NG, Y. K., SHANMUGARATNAM, K. Risk factors for lung cancer in Singapore Chinese, a population with high female incidence rates. *Int. J. Cancer.*, v. 20, p. 854-860, 1977.
- MAGEE, P. N., FARBER, E. Toxic liver injury and carcinogenesis: methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine *in vivo*. *Biochem. J.*, v. 83, p. 114-124, 1962.
- MAHLEY, R. W., HUSSAIN, M. M. Chylomicron and chylomicron remnant catabolism. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 2, p. 170-176, 1991.
- MAIORANA, A., GULLINO, P. M. Effect of retinyl acetate on the incidence of mammary carcinomas and hepatomas in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 64, p. 655-663, 1980.
- MAJIMA, T., TSUTSUMI, M., NISHINO, H., TSUNODA, T., KONISHI, Y. Inhibitory effects of beta-carotene, palm carotene, and green tea polyphenols on pancreatic carcinogenesis initiated by *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in Syrian golden hamsters. *Pancreas*, v. 16, p. 13-18, 1998.
- MANGELS, A. R., HOLDEN, J. M., BEECHE, G. R., FORMAN, M. F., LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: An evaluation of analytic data. *J. Am. Diet. Assoc.*, v. 93, p. 284-296, 1993.
- MANGELSDORF, D. J. Vitamin A receptors. *Nutr. Rev.*, v. 52, p. S32-S44, 1994.
- MANGELSDORF, D. J., UMESONO, K., KIEWER, S. A., BORGMEYER, U., ONG, E. S., EVANS, R. M. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell*, v. 66, p. 555-561, 1991.
- MANGELSDORF, D. J., UMESONO, K., EVANS, R. M. The retinoid receptors. In: *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. M. B. SPORN, A. B. ROBERTS, D. S. GOODMAN, eds. Raven Press Ltd., New York, 2nd. ed., p. 319-349, 1994.

- MANJESHWAR, S., LACONI, E., RAO, P. M., RAJALAKSHMI, S., SARMA, D. S. R. Influence of orotic acid on multistage hepatocarcinogenesis in the rat: resistance of hepatocytes from nodules to the mitoinhibitory effects of orotic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 202, p. 25-29, 1993.
- MANORAMA, R., CHINNASAMY, N., RUKMINI, C. Effect of palm oil on some hepatic drug-metabolizing enzymes in rats. *Food Chem. Toxicol.*, v. 31, p. 583-588, 1993.
- MARNETT, L. J. Aspirin and potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res.*, v. 52, p. 5575-5589, 1992.
- MARSHALL, H., MORRISON, A., STUDER, M., PÖPPERL, H., KRUMLAUF, R. Retinoids and *Hox* genes. *FASEB J.*, v. 10, p. 969-978, 1996.
- MATHEWS-ROTH, M. M. The carotenoid content of various organs of animals administered large amounts of beta-carotene. *Nutr. Rep. Int.*, v. 117, p. 419-423, 1977.
- MATHEWS-ROTH, M. M. Antitumor activity of beta-carotene, canthaxanthin and phytoene. *Oncology*, v. 39, p. 33-37, 1982.
- MATHEWS-ROTH, M. M. Carotenoid pigment administration and delay in development of UV-B-induced tumors. *Photochem. Photobiol.*, v. 37, p. 509-511, 1983.
- MATHEWS-ROTH, M. M. Carotenoids and cancer prevention - experimental and epidemiological studies. *Pure Appl. Chem.*, v. 57, p. 717-722, 1985.
- MATHEWS-ROTH, M. M. Beta-carotene: clinical aspects. In: *New Protective Roles for Selected Nutrients*. Alan R. Liss, Inc., p. 17-38, 1989.
- MATHEWS-ROTH, M. M. Recent progress in the medical applications of carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, v. 63, p. 147-156, 1991.
- MATHEWS-ROTH, M. M., KRINSKY, N. I. Carotenoid dose level and protection against UV-B induced skin tumors. *Photochem. Photobiol.*, v. 42, p. 35-38, 1985.
- MATHEWS-ROTH, M. M., KRINSKY, N. I. Carotenoids affect development of UV-B induced skin cancer. *Photochem. Photobiol.*, v. 46, p. 507-509, 1987.
- MATSUSHIMA-NISHIWAKI, R., SHIDOJI, Y., NISHIWAKI, S., YAMADA, T., MORIWAKI, H., MUTO, Y. Suppression by carotenoids of microcystin-induced morphological changes in mouse hepatocytes. *Lipids*, v. 30, p. 1029-1034, 1995.
- MAYNE, S. T., PARKER, R. S. Subcellular distribution of dietary β -carotene in chick liver. *Lipids*, v. 21, p. 164-169, 1986.
- MAYNE, S. T. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.*, v. 10, p. 690-701, 1996.
- MAZIN, A. L. Replicative and postreplicative DNA methylation as a generator of mutations in the cell (a review). *Mol. Biol.*, v. 27, p. 593-602, 1993.

- MCCOLLUM, E. V., DAVIS, M. The necessity of certain lipids during growth. *J. Biol. Chem.*, v. 15, p. 167-175, 1913.
- MCCORMICK, D. L., HOLLISTER, J. L., BAGG, B. J., LONG, R. E. Enhancement of murine hepatocarcinogenesis by all-*trans*-retinoic acid and two synthetic retinamides. *Carcinogenesis*, v. 11, p. 1605-1609, 1990.
- MCLARTY, J. W., HOLIDAY, D. B., GIRARD, W. M., YANAGIHARA, R. H., KUMMET, T. D., GREENBERG, S. D. Beta-carotene, vitamin A and lung cancer chemoprevention: results of an intermediate endpoint study. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 62, p. 1431S-1438S, 1995.
- MEISTER, A. On the enzymology of amino acid transport. *Science*, v. 180, p. 33-39, 1973.
- MEISTER, A. Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res.*, v. 54, p. 1969S-1975S, 1994.
- MELNICK, R. L. Does chemically induced hepatocyte proliferation predict liver carcinogenesis. *FASEB J.*, v. 6, p. 2698-2706, 1992.
- MERTZ, J. R., SHANG, E., PIANTEDOSI, R., WEI, S., WOLGEMUTH, D. J., BLANER, W. S. Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-*cis*-retinol oxidation. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 11744-11749, 1997.
- MESTRE, J. R., SUBBARAMAIAH, K., SACKS, P. G., SCHANTZ, S. P., TANABE, T., INOUE, H., DANNENBERG, A. J. Retinoids suppress phorbol ester-mediated induction of cyclooxygenase-2. *Cancer Res.*, v. 57, p. 1081-1085, 1997.
- MEYDANI, S. N., WU, D., SANTOS, S. M., HAYEK, M. G. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 62, p. 1462S-1476S, 1995.
- MEYSKENS JR., F. L., MANETTA, A. Prevention of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 62, p. 1417S-1419S, 1995.
- MEYSKENS JR., F. L., LIU, P. Y., TUTHILL, R. J., SONDAK, V. K., FLETCHER, W. S., JEWELL, W. R., SAMLOWSKI, W., BALCERZAK, S. P., RECTOR, D. J., NOYES, D., COSTANZI, J. J. Randomized trial of vitamin A versus observation as adjuvant therapy in high-risk primary malignant melanoma: a Southwest Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.*, 12, p. 2060-2065, 1994.
- MIKOL, Y. B., HOOVER, K. L., CREASIA, D., POIRIER, L. A. Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid defined diets. *Carcinogenesis*, v. 4, p. 1619-1629, 1983.
- MILLER, E. C., MILLER, J. A. Mechanisms of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharm. Rev.*, v. 18, p. 805-838, 1966.
- MILLER, J. A., MILLER, E. C. Chemical carcinogenesis: mechanism and approaches to its control. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 47, p. V-XIV, 1971.
- MONTESANO, R., HAINAUT, P., WILD, C. P. Hepatocellular carcinoma: from gene to public health. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 89, p. 1844-1851, 1997.

- MOOLGAVKAR, S. H. Carcinogenesis modeling: from molecular biology to epidemiology. *Annu. Rev. Public Health*, v. 7, p. 151-169, 1986.
- MOON, R. C., MEHTA, R. G. Anticarcinogenic effects of retinoids in animals. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 206, p. 399-411, 1986.
- MOON, R. C., MEHTA, R. G. Chemoprevention of mammary cancer by retinoids. *Basic Life Sci.*, v. 52, p. 213-224, 1990.
- MOON, R. C., GRUBBS, C. J., SPORN, M. B. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary carcinogenesis by retinyl acetate. *Cancer Res.*, v. 36, p. 2626-2630, 1976.
- MOON, R. C., MEHTA, R. G., RAO, K. V. N. Retinoids and cancer in experimental animals. In: *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. M. B. SPORN, A. B. ROBERTS, D. S. GOODMAN, eds. Raven Press Ltd., New York, 2nd. ed., p. 597-630, 1994.
- MOON, T. E., LEVINE, N., CARTMEL, B., BANGERT, J. L., RODNEY, S., DONG, Q., PENG, Y. -M., ALBERTS, D. S. Effect of retinol in preventing squamous cell skin cancer in moderate-risk subjects: a randomized, double-blind, controlled trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 6, p. 949-956, 1997.
- MOORE, A. C., GUGGER, E. T., ERDMAN, J. W. Brush border membrane vesicles from rats and gerbils can be utilized to evaluate the intestinal uptake of all-trans and 9-cis beta-carotene. *J. Nutr.*, v. 126, p. 2904-2912, 1996.
- MOORE, M. A., MAYER, D., BANNASCH, P. The dose dependence and sequential appearance of putative preneoplastic populations induced in the rat liver by stop experiments with NNM. *Carcinogenesis*, v. 3, p. 1429-1436, 1982.
- MOORE, T. Vitamin A and carotene. VI. The conversion of β -carotene to vitamin A *in vivo*. *Biochem. J.*, v. 24, p. 692-702, 1930.
- MORDAN, L. J. Inhibition by retinoids of platelet growth factor-dependent stimulation of DNA synthesis and cell division in density-arrested C3H 10T1/2 fibroblasts. *Cancer Res.*, v. 49, p. 906-909, 1989.
- MORENO, F. S., GHAZARIAN, D. M., SHARMA, R. K., FARBER, E., GHOSHAL, A. K. Free radical generation and DNA alteration in the rat liver by choline deficient diet with 15% corn oil. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, v. 31, p. 143, 1990.
- MORENO, F. S., RIZZI, M. B. S. L., DAGLI, M. L. Z., PENTEADO, M. V. C. Inhibitory effects of β -carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis*, v. 12, p. 1817-1822, 1991.
- MORENO, F. S., WU, T. -S., PENTEADO, M. V. C., RIZZI, M. B. S. L., JORDÃO JR., A. A., ALMEIDA-MURADIAN, L. B., DAGLI, M. L. Z. A comparison of β -carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, v. 65, p. 87-94, 1995a.
- MORENO, F. S., ROSSIELLO, M. R., MANJESHWAR, S., NATH, R., RAO, P. M., RAJALAKSHMI, S., SARMA, D. S. R. Effect of β -carotene on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. *Cancer Lett.*, v. 96, p. 201-208, 1995b.

- MORI, S. The changes in the paraocular glands which follow the administration of diets low in fat-soluble A with notes of the effects of the same diets on the salivary glands and the mucosa of the larynx and bronchea. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, v. 33, p. 357-359, 1922.
- MORSE, M. A., STONER, G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis*, v. 14, p. 1737-1746, 1993.
- MUKHERJEE, A., AGARWAL, K., AGUILAR, M. A., SHARMA, A. Anticlastogenic activity of β -carotene against cyclophosphamide in mice *in vivo*. *Mutat. Res.*, v. 263, p. 41-46, 1991.
- MÜNZEL, P. A., PFOHL-LESZKOWICZ, A., RÖHRDANZ, E., KEITH, G., DIRHEIMER, G., BOCK, K. W. Site-specific hypomethylation of *c-myc* protooncogene in liver nodules and inhibition of DNA methylation by *N*-nitrosomorpholine. *Biochem. Pharmacol.*, v. 42, p. 365-371, 1991.
- MURAKOSHI, M., TAKAYASU, J., KIMURA, O., KOHMURA, E., NISHINO, H. Inhibitory effects of α -carotene on proliferation of the human neuroblastoma cell line GOTO. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 81, p. 1649-1652, 1989.
- MUTO, Y., MORIWAKI, H., NINOMIYA, M., ADACHI, S., SAITO, A., TAKASAKI, K. T., TANAKA, T., TSURUMI, K., OKUNO, M., TOMITA, E., NAKAMURA, T., KOJIMA, T., pelo Hepatoma Prevention Study Group. Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, v. 334, p. 1561-1567, 1996.
- NAGAO, A., OLSON, J. A. Enzymatic formation of 9-*cis*, 13-*cis*, and all-*trans* retinals from isomers of β -carotene. *FASEB J.*, v. 8, p. 968-973, 1994.
- NAGASAWA, H., FUJII, Y., KAGEYAMA, Y., SEGAWA, T., BEN-AMOTZ, A. Suppression by beta-carotene-rich algae *Dunaliella bardawil* of the progression, but not the development, of spontaneous mammary tumors in SHN virgin mice. *Anticancer Res.*, v. 11, p. 713-718, 1991.
- NAGPAL, S., ATHANIKAR, J., CHANDRARATNA, R. A. S. Separation of transactivation and AP1 antagonism functions of retinoic acid receptor α . *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 923-927, 1995.
- NAKAE, D., KOBAYASHI, Y., AKAI, H., ANDOH, N., SATOH, H., OHASHI, K., TSUTSUMI, M., KONISHI, Y. Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of *N*-nitrosodiethylamine. *Cancer Res.*, v. 57, p. 1281-1287, 1997.
- NAKSHATRI, H., CHAMBON, P. The directly repeated RG(G/T)TCA motifs of the rat and mouse cellular retinol-binding protein genes are promiscuous binding sites for RAR, RXR, HNF-4, and ARP-1 homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 890-902, 1994.
- NAPOLI, J. L. Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis. *J. Nutr.*, v. 123, p. 362-366, 1993.
- NAPOLI, J. L. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.*, v. 10, p. 993-1001, 1996a.
- NAPOLI, J. L. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism and signal transduction. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v. 80, p. S52-S62, 1996b.
- NAPOLI, J. L., RACE, K. R. Biogenesis of retinoic acid from β -carotene. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 17372-17377, 1988.

- NAPOLI, J. L., BOERMAN, M. H. E. M., CHAI, Y. Z., FIORELLA, P. D. Enzymes and binding proteins affecting retinoic acid concentrations. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, v. 53, p. 497-502, 1995.
- NAVES, M. M. V., MORENO, F. S. β -Carotene and cancer chemoprevention: from epidemiological associations to cellular mechanisms of action. *Nutr. Res.*, v. 18, p. 1807-1824, 1998.
- NEWBERNE, P. M. Biological activity of the aflatoxins in domestic and laboratory animals. *U.S. Fish Wildlife Serv. Res. Rep.*, v. 70, p. 131, 1967.
- NEWBERNE, P. M., ROGERS, A. E. Aflatoxin carcinogenesis in the rat: an animal model. *Am. J. Pathol.*, v. 72, p. 137-140, 1973a.
- NEWBERNE, P. M., ROGERS, A. E. Rat colon carcinomas associated with aflatoxin and marginal vitamin A. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 50, p. 439-448, 1973b.
- NEWBERNE, P. M., SUPHAKARN, V. Prevention role of vitamin A on colon carcinogenesis in rats. *Cancer*, v. 40, p. 2553-2556, 1977.
- NIKAWA, T., SCHULZ, W. A., VAN DEN BRINK, C. E., HANUSCH, M., VAN DER SAAG, P., STAHL, W., SIES, H. Efficacy of all-trans- β -carotene, canthaxanthin, and all-trans-, 9-cis-, and 4-oxoretinoic acids in inducing differentiation of an F9 embryonal carcinoma RAR- β -lac Z reporter cell line. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 316, p. 665-672, 1995.
- NOY, N., XU, Z. J. Interaction of retinol with binding proteins: implication for the mechanism of uptake by cells. *Biochemistry*, v. 29, p. 3878-3883, 1990.
- NOY, N., BLANER, W. S. Interactions of retinol with binding proteins: studies with rat cellular retinol-binding protein and rat retinol-binding protein. *Biochemistry*, v. 30, p. 6380-6386, 1991.
- NURSE, P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, v. 79, p. 547-550, 1994.
- OGAWA, K., MEDLINE, A., FARBER, E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: the comparative architecture of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. *Br. J. Cancer*, v. 40, p. 782-790, 1979a.
- OGAWA, K., MEDLINE, A., FARBER, E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: a comparative study of the ultrastructure of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. *Lab. Invest.*, v. 41, p. 22-35, 1979b.
- OHASHI, K., TSUTSUMI, M., TSUJIUCHI, T., KOBITSU, K., OKAJIMA, E., NAKAJIMA, Y., NAKANO, H., TAKAHASHI, M., MORI, Y., KONISHI, Y. Enhancement of N-nitrosodiethylamine initiated hepatocarcinogenesis caused by a colchicine-induced cell cycle disturbance in partially hepatectomized rats. *Cancer Res.*, v. 56, p. 3474-3479, 1996.
- OHKAWA, K., ABE, T., HATANO, T., TAKIZAWA, N., YAMADA, K., AKADA, K. The facilitated effect of retinol on rat hepatocarcinogenesis induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Carcinogenesis*, v. 12, p. 2357-2360, 1991.
- OKOH, C., MYCHKOWSKY, I., LAKSHMAN, M. R. Isolation and some properties of a carotenoid-protein complex from rat liver. *J. Nutr. Biochem.*, v. 4, p. 569-575, 1993.

- OLIVEIRA, V. N. Atividade quimiopreventiva do fenilacetato em modelo de hepatocarcinogênese. São Paulo, 113 p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo], 1998.
- OLSON, J. A. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of β -carotene into vitamin A. *J. Nutr.*, v. 119, p. 105-108, 1989a.
- OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. *J. Nutr.*, v. 119, p. 94-95, 1989b.
- OLSON, J. A. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. *Pure & Appl. Chem.*, v. 66, p. 1011-1016, 1994a.
- OLSON, J. A. Needs and sources of carotenoids and vitamin A. *Nutr. Rev.*, v. 52, p. S67-S73, 1994b.
- OLSON, J. A. Vitamin A, retinoids and carotenoids. In: *Modern Nutrition in Health and Disease*, M. E. SHILS, J. A. OLSON, M. SHIKE, eds. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 178-209, 1994c.
- OLSON, J. A. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. *J. Nutr.*, v. 126, p. 1208S-1212S, 1996.
- OLSON, J. A., HAYAISHI, O. The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 54, p. 1364-1370, 1965.
- OLSON, J. A., KRINSKY, N. I. Introduction: The colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *FASEB J.*, v. 9, p. 1547-1550, 1995.
- OMENN, G. S., GOODMAN, G. E., THORNQUIST, M. D., BALMES, J., CULLEN, M. R., GLASS, A., KEOGH, J. P., MEYSKENS JR., F. L., VALANIS, B., WILLIAMS JR., J. H., BARNHART, S., HAMMAR, S. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 334, p. 1150-1155, 1996.
- OMS. *The World Health Report Geneva: WHO*, 1997.
- ONG, D. E. Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr. Rev.*, v. 52, p. S24-S31, 1994.
- OPIE, E. L. The pathogenesis of tumors in the liver produced by butter yellow. *J. Exp. Med.*, v. 80, p. 231-246, 1944.
- ORR, I. M. Oral cancer in betel nut chewers in Travancore: its aetiology, pathology and treatment. *Lancet*, v. ii, p. 575-580, 1933.
- OSHIMA, J., CAMPISI, J. Fundamentals of cell proliferation: control of the cell cycle. *J. Dairy Sci.*, v. 74, p. 2778-2787, 1991.
- PALOZZA, P., KRINSKY, N. I. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vivo*: an overview. *Methods Enzymol.*, v. 213, p. 403-420, 1992.
- PARK, C. K., ISHIMI, Y., OHMURA, M., YAMAGUCHI, M., IKEGAMI, S. Vitamin A and carotenoids stimulate differentiation of mouse osteoblastic cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v. 43, p. 281-296, 1997.

- PARKER, R. S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.*, v. 10, p. 542-551, 1996.
- PASCALE, R. M., MARRAS, V. M., SIMILE, M. M., DAINO, L., PINNA, G., BENNATI, S., CARTAM M., SEDDAIU, M. A., MASSARELLI, G., FEO, F. Chemoprevention of rat liver carcinogenesis by S-adenosyl-L-methionine: a long term study. *Cancer Res.*, v. 52, p. 4979-4986, 1992.
- PASTORINO, U., INFANTE, M., MAIOLI, M., CHIESA, G., BUYSE, M., FIRKET, P., ROSMENTZ, N., CLERICI, M., SORESI, E., VALENTE, M., BELLONI, P. A., RAVASI, G. Adjuvant treatment of stage I lung cancer with high-dose vitamin A. *J. Clin. Oncol.*, v. 11, 1216-1222, 1993.
- PEGG, A. E. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth as a target for chemotherapy. *Cancer Res.*, v. 48, p. 759-774, 1988.
- PELTOMÄKI, P., AALTONEN, L. A., SISTONEN, P., PYLKKÄNEN, L., MECKLIN, J. P., JÄRVINEN, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*, v. 260, p. 810-812, 1993.
- PENTEADO, M. V. C., MINAZZI, R. S., ALMEIDA, L. B. Carotenóides e atividade pró-vitáminica A de folhas de hortaliças consumidas no Norte do Brasil. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, v. 22, p. 97-102, 1986.
- PERAINO, C., FRY, R. J. M., STAFFELD, E. Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res.*, v. 31, p. 1506-1512, 1971.
- PERRY, T. M. The new and old diseases: A study of mortality trends in the United States, 1900-1969. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 63, p. 453-474, 1975.
- PETO, R., DOLL, R., BUCKLEY, J. D., SPORN, M. B. Can dietary β -carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*, v. 290, p. 201-208, 1981.
- PEZZUTO, J. M. Plant-derived anticancer agents. *Biochem. Pharmacol.*, v. 53, p. 121-133, 1997.
- PHILLIPS, R. L. Role of lifestyle and dietary habits in risk of cancer among Seventh Day Adventists. *Cancer Res.*, v. 35, p. 3513-3522, 1975.
- PHILLIPS, R. W., KIKENDALL, J. W., LUK, G. D., WILLIS, S. M., MURPHY, J. R., MAYDONOVITCH, C., BOWEN, P. E., STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, WONG, R. K. K. Beta-carotene inhibits rectal mucosa ornithine decarboxylase activity in colon cancer patients. *Cancer Res.*, v. 53, p. 3723-3725, 1993.
- PINTO, C. B., COLEMAN, M. P. Cancer mortality in Rio de Janeiro. *Int. J. Cancer*, v. 46, p. 173-177, 1990.
- PISTOI, S., MORELLO, D. Prometheus' myth revisited: transgenic mice as a powerful tool to study liver regeneration. *FASEB J.*, v. 10, p. 819-828, 1996.
- PITOT, H. C. Altered hepatic foci: their role in murine hepatocarcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 30, p. 465-500, 1990.
- PITOT, H. C., DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.*, v. 5, p. 2280-2286, 1991.
- PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, v. 72, p. 962-970, 1993.

- PITOT, H. C. The role of receptors in multistage carcinogenesis. *Mutat. Res.*, v. 333, p. 3-14, 1995.
- PITOT, H. C., BARSNESS, L., GOLDSWORTHY, T., KITAGAWA, T. Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. *Nature*, v. 271, p. 456-458, 1978.
- PITOT, H. C., DRAGAN, Y. P., TEEGUARDEN, J., HSIA, S., CAMPBELL, H. Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. *Toxicol. Pathol.*, v. 24, p. 119-128, 1996.
- POIRIER, L. A. Methyl group deficiency in hepatocarcinogenesis. *Drug Metab. Rev.*, v. 26, p. 185-199, 1994.
- PONDER, B. A. J. Inherited predisposition to cancer. *Trends Genet.*, v. 6, p. 213-218, 1990.
- PONDER, B. A. J. Molecular genetics of cancer. *Br. Med. J.*, v. 304, p. 1234-1236, 1992.
- PONDER, K. P. Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies. *FASEB. J.*, v. 10, p. 673-684, 1996.
- POOL-ZOBEL, B. L., BUB, A., MÜLLER, H., WOLLOWSKI, I., RECHKEMMER, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 1847-1850, 1997.
- POOR, C. L., BIERER, T. L., MERCHEN, N. R., FAHEY, G. C., ERDMAN, J. W. The accumulation of alpha- and beta-carotene in serum and tissues of preruminant calves fed raw and steamed carrot slurries. *J. Nutr.*, v. 123, p. 1296-1304, 1993.
- POTT, P. *Chirurgical Observations*. London, Hawkes, Clarke & Collins, p. 63, 1775.
- POTTER, V. R. A new protocol and its rationale for the study of initiation and promotion of carcinogenesis in rat liver. *Carcinogenesis*, v. 2, p. 1375-1379, 1981.
- POUND, A. W., MCGUIRE, L. J. Repeated partial hepatectomy as a promoting stimulus for carcinogenic response of liver to nitrosamines in rats. *Br. J. Cancer*, v. 37., p. 585-594, 1978.
- POWIS, G., GASDASKA, J. R., BAKER, A. Redox signaling and the control of cell growth and death. In: *Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy*. H. SIES, ed. Academic Press, San Diego, p. 329-402, 1997.
- PRICE, J. M., HARMAN, J. W., MILLER, E. C., MILLER, J. A. Progressive microscopic alterations in the livers of rats fed the hepatic carcinogens 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene and 4'-fluor-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.*, v. 12, p. 192-200, 1952.
- PRIMIANO, T., SUTTER, T. R., KENSLER, T. W. Antioxidant-inducible genes. In: *Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy*. H. SIES, ed. Academic Press, San Diego, p. 293-328, 1997.
- PUNG, A. O., RUNDHAUG, J. E., YOSHIZAWA, C. N., BERTRAM, J. S. β -Carotene and canthaxanthin inhibit chemically- and physically-induced neoplastic transformation in 10T1/2 cells. *Carcinogenesis*, v. 9, p. 1533-1539, 1988.
- RAICA, N., SCOTT, J., LOWRY, L., SAUBERLICH, H. E. Vitamin A concentration in human tissues collected from five areas in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 25, p. 291-296, 1972.

- RAJALAKSHMI, S., RAO, P. M., SARMA, D. R. S. Studies on carcinogen chromatin-DNA interaction: inhibition of *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced methylation of chromatin-DNA by spermine and distamycin A. *Biochemistry*, v. 17, p. 4515-4518, 1978.
- RAJALAKSHMI, S., RAO, P. M., SARMA, D. S. R. Chemical carcinogenesis: interaction of carcinogens with nucleic acids. In: *Cancer: a Comprehensive Treatise*. F. F. BECKER, ed. New York, Plenum Press, 2d. ed., vol. 1, p. 335, 1982.
- RAMAZINI, B. *Diseases of workers*. (Tradução do texto latino por Wilmer Cave Wright). Chicago, University of Chicago Press, p. 191, 1940.
- RAMSDEN, M., COLE, G., SMITH, J., BALMAIN, A. Differential methylation of the c-H-ras gene in normal mouse cells and during skin tumour progression. *EMBO J.*, v. 4, p. 1449-1454, 1985.
- RAO, M. N., GHOSH, P., LAKSHMAN, M. R. Purification and partial characterization of a cellular carotenoid-binding protein from ferret liver. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 24455-24460, 1997.
- RAO, M. S., REDDY, J. K. Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 8, p. 631-636, 1987.
- RAO, P. M., NAGAMINE, K., HO, R. K., ROOMI, M. W., LAURIER, C., SARMA, D. S. R. Dietary orotic acid enhances the incidence of γ -glutamyltransferase positive foci in rat liver induced by chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, v. 4, p. 1541-1545, 1983.
- RAO, P. M., ANTONY, A., RAJALAKSHMI, S., SARMA, D. S. R. Studies on hypomethylation of liver DNA during early stages of chemical carcinogenesis in rat liver. *Carcinogenesis*, v. 10, p. 933-937, 1989.
- RAPPAPORT, A. M., BOROWY, Z. J., LOUGHEED, W. M., LOTTO, W. N. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. *Anat. Rec.*, v. 119, p. 11-27, 1954.
- RAZIN, A., CEDAR, H. DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.*, v. 55, p. 451-458, 1991.
- RAZIN, A., CEDAR, H. DNA methylation and genomic imprinting. *Cell*, v. 77, p. 473-476, 1994.
- REDDY, B. S. Micronutrients as chemopreventive agents. *IARC Sci. Publ.*, v. 139, p. 221-235, 1996.
- REDDY, G. P. V. Cell cycle: regulatory events in G1 — transition of mammalian cells. *J. Cell. Biochem.*, v. 54, p. 379-386, 1994.
- REDDY, J. K., RAO, S. Peroxisome proliferation-related oxidative stress and hepatocarcinogenesis. In: *Anticarcinogenesis and Radiation Protection*. P. A. CERUTTI, O. F. NYGAARD, M.G. SIMIC, eds. New York, Plenum Press, p. 85-91, 1987.
- REDDY, J. K., AZARNOFF, D. L., HIGNITE, C. E. Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature*, v. 283, p. 397-398, 1980.
- RENNER, H. W. Anticlastogenic effect of β -carotene in Chinese hamsters. Time and dose-response studies with different mutagens. *Mutat. Res.*, v. 144, p. 251-256, 1995.

- RETTENMAIER, R., SCHUEP, W. Determination of vitamins A and E in liver tissue. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, v. 62, p. 312-317, 1992.
- RETTURA, G., STRATFORD, F., LEVENSON, S. M., SEIFTER, E. Prophylactic and therapeutic actions of supplemental β -carotene in mice inoculated with C3HBA adenocarcinoma cells: lack of therapeutic action of supplemental ascorbic acid. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 69, p. 73-77, 1982.
- REUBER, M. D. Development of preneoplastic and neoplastic lesions of the liver in male rats given 0.025% N-2-fluorenyldiacetamide. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 34, p. 697-723, 1965.
- RIBAYA-MERCADO, J. D., HOLMGREN, S. C., FOX, J. G., RUSSELL, R. M. Dietary β -carotene absorption and metabolism in ferrets and rats. *J. Nutr.*, v. 119, p. 665-668, 1989.
- RIDEOUT III, W. M., EVERSOLE-CIRE, P., SPRUCK III, C. H., HUSTAD, C. M., COETZEE, G. A., GONZALES, F. A., JONES, P. A. Progressive increases in the methylation status and heterochromatinization of the *myoD* CpG island during oncogenic transformation. *Mol. Cell. Biol.*, v. 14, p. 6143-6152, 1994.
- RIEDER, A., ADAMEK, M., WRBA, H. Delay of diethylnitrosamine-induced hepatoma in rats by carrot feeding. *Oncology*, v. 40, 120-123, 1983.
- RIGTRUP, K. M., MCEWEN, L. R., SAID, H. M., ONG, D. E. Retinyl ester hydrolytic activity associated with human intestinal brush border membranes. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 60, p. 111-116, 1994.
- RININGER, J. A., GOLDSWORTHY, T. L., BABISH, J. G. Time course comparison of cell-cycle protein expression following partial hepatectomy and WY14,643-induced hepatic cell proliferation in F-344 rats. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 935-941, 1997.
- RIZZI, M. B. S. L., DAGLI, M. L. Z., JORDÃO JR., A. A., PENTEADO, M. V. C., MORENO, F. S. β -Carotene inhibits persistent and stimulates remodeling γ GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, v. 67, p. 415-422, 1997.
- ROBERTS, E. S., VAZ, A. D. N., COON, M. J. Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol. Pharmacol.*, v. 41, p. 427-433, 1992.
- ROBERTS, J. M. Turning DNA replication on and off. *Curr. Op. Cell Biol.*, v. 5, p. 201-206, 1993.
- ROCK, C. L., SWENDSEID, M. E. Plasma β -carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 55, p. 96-99, 1992.
- ROGERS, A. E., ZEISEL, S. H., GROOPMAN, J. Diet and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 14, p. 2205-2217, 1993.
- RONNE, H., OCKLIND, C., WIMAN, K., RASK, L., OBRINK, B., PETERSON, P. A. Ligand-dependent regulation of intracellular protein transport: effect of vitamin A on the secretion of the retinol-binding protein. *J. Cell Biol.*, v. 96, p. 907-910, 1983.
- ROOMI, M. W., KO, R. H., SARMA, D. S. R., FARBER, E. A common biochemical pattern in preneoplastic hepatocyte nodules generated in four different models in the rat. *Cancer Res.*, v. 45, p. 564-571, 1985.

- ROSS, A. C. Vitamina A status: relationship to immunity and the antibody responses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 200, p. 303-320, 1992.
- ROSS, A. C. Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J.*, v. 7, p. 317-327, 1993.
- ROSS, A. C., STEPHENSEN, C. B. Vitamin A and retinoids in antiviral responses. *FASEB J.*, v. 10, p. 979-985, 1996.
- ROSS, A. C., TERNUS, M. E. Vitamina A as a hormone: Recent advances in understanding the actions of retinol, retinoic acid, and beta-carotene. *J. Am. Diet. Assoc.*, v. 93, p. 1285-1290, 1993.
- ROTSTEIN, J., SARMA, D. S. R., FARBER, E. Sequential alterations in growth control and cell dynamics of rat hepatocytes in early precancerous steps in hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 46, p. 2377-2385, 1986.
- ROULEAU, J., MACLEOD, R., SZYF, M. Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-Ap-1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 1595-1601, 1995.
- ROUS, P., KIDD, J. G. Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states. A study of tar tumors in rabbits. *J. Exp. Med.*, v. 73, p. 365-376, 1941.
- ROUSSEAU, E. J., DAVISON, A. J., DUNN, B. P. Protection by β -carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 13, p. 407-433, 1992.
- RUBERTE, E., DOLLÉ, P., KRUST, A., ZELENT, A., MORRIS-KAY, G., CHAMBON, P. Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. *Development*, v. 108, p. 213-222, 1990.
- RUNDHAUG, J. E., PUNG, A., READ, C. M., BERTRAM, J. S. Uptake and metabolism of β -carotene and retinal by C3H/10T1/2 cells. *Carcinogenesis*, v. 9, p. 1541-1545, 1988.
- RUSHMORE, T. H., FARBER, E., GHOSHAL, A. K., PARODI, S., PALA, M., TANINGHER, M. A choline devoid diet, carcinogenic in the rat, induces DNA damage and repair. *Carcinogenesis*, v. 7, p. 1677-1680, 1986.
- RUTENBURG, A. M., KIM, H., FISCHEIN, J. W., HANKER, J. S., WASSERKRUG, H. L., SELIGMAN, A. M. Histochemical and ultrastructural demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase activity. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 17, p. 517-526, 1969.
- SADEK, I. A., HAYAT, L. G. Initiation and post-initiation chemopreventive effects of beta-carotene in toad liver carcinogenesis. *Histol. Histopathol.*, v. 11, p. 357-360, 1996.
- SAFFIOTTI, U., MONTESANO, R., SELLAKUMA, A. R., BORK, S. A. Experimental cancer of the lung. *Cancer*, v. 20, 857-864, 1967.
- SAGER, R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science*, v. 246, p. 1406-1412, 1989.
- SALBERT, G., FANJUL, A., PIEDRAFITA, F. J., LU, X. P., KIM, S. -J., TRAN, P., PFAHL, M. Retinoic acid receptors and retinoid X receptor- α down-regulate the transforming growth factor- β 1 promoter by antagonizing AP-1 activity. *Mol. Endocrinol.*, v. 7, p. 1347-1356, 1993.

- SALVADORI, D. M. F., RIBEIRO, L. R., OLIVEIRA, M. D. M., PEREIRA, C. A. B., BEÇAK, W. Beta-carotene as a modulator of chromosomal aberrations induced in mouse bone marrow cells. *Env. Mol. Mut.*, v. 20, p. 206-210, 1992.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd. ed., New York, 1989.
- SAMPAIO, A. R. D. Metilação do DNA em ratos Wistar tratados com β -caroteno ou vitamina A e submetidos a modelo de hepatocarcinogênese. São Paulo, 120 p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo], 1998.
- SANTAMARIA, L., BIANCHI, A., ARNABOLDI, A., ANDREONI, L., BERMOND, P. Dietary carotenoids block photocarcinogenic enhancement by benzo(a)pireno and inhibits its carcinogenesis in the dark. *Experientia*, v. 39, p. 1043-1045, 1983.
- SANTAMARIA, L., BIANCHI, A., RAVETTO, C., ARNABOLDI, A., SANTAGATI, G., ANDREONI, L. Prevention of gastric cancer induced by *N*'-metil-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine in rats fed supplemental carotenoids. *J. Nutr. Growth Cancer*, v. 4, p. 175-181, 1987.
- SANTOS, M. S., MEYDANI, S. N., LEKA, L., WU, D., FOTOUI, N., MEYDANI, M., HENNEKENS, C. H., GAZIANO, J. M. Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by β -carotene supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 64, p. 772-777, 1996.
- SARGENT, L., DRAGAN, Y., XU, Y. H., SATTLER, G., WILEY, J., PITOT, H. C. Karyotypic changes in a multistage model of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res.*, v. 56, p. 2985-2991, 1996.
- SARKAR, A., MUKHERJEE, B., CHATTERJEE, M. Inhibitory effect of β -carotene on 2-acetylaminofluorene induced hepatocarcinogenesis in rat: reflection in hepatic drug metabolism. *Carcinogenesis*, v. 15, p. 1055-1060, 1994.
- SARKAR, A., BISHAYEE, A., CHATTERJEE, M. Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepatocarcinogenesis. *Cancer Biochem. Biophys.*, v. 15, p. 111-125, 1995a.
- SARKAR, A., MUKHERJEE, B., CHATTERJEE, M. Inhibition of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene-induced hepatocarcinogenesis in rat by dietary β -carotene changes in hepatic anti-oxidant defense enzyme levels. *Int. J. Cancer*, v. 61, p. 799-805, 1995b.
- SARKAR, A., BASAK, R., BISHAYEE, A., BASAK, J., CHATTERJEE, M. Beta-carotene inhibits rat liver chromosomal aberrations and DNA chain break after a single injection of diethylnitrosamine. *Br. J. Cancer*, v. 76, p. 855-861, 1997.
- SASAKI, T., YOSHIDA, T. Experimentelle Erzeugung des Lebercarcinoms durch Fütterung mit o-Amidoazotoluol. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, v. 295, p. 175-200, 1935.
- SCHERER, E. Relationship among histochemically distinguishable early lesions in multistep-multistage hepatocarcinogenesis. *Arch. Toxicol.*, v. 10, p. 81-94, 1987.
- SCHMÄHL, D., PREUSSMANN, R., HAMPERL, H. Leberkrebserzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten. *Naturwissenschaften*, v. 47, p. 89, 1960.

- SCHMANDT, R., MILLS, G. B. Genomic components of carcinogenesis. *Clin. Chem.*, v. 39, p. 2375-2385, 1993.
- SCHMITZ, H. H., POOR, C. L., WELLMAN, R. B., ERDMAN, J. W. Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue. *J. Nutr.*, v. 121, p. 1613-1621, 1991.
- SCHULTE-HERMANN, R. Tumor promotion in the liver. *Arch. Toxicol.*, v. 57, p. 147-158, 1985.
- SCHULTE-HERRMANN, R., TIMMERMANN-TROSIENER, I., BARTHEL, G., BURSCH, W. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Res.*, v. 50, p. 5127-5135, 1990.
- SCHULZE-OSTHOFF, K., LOS, M., BAEUERLE, P. A. Redox signalling by transcription factors NF- κ B and AP-1 in the immune system. *Biochem. Pharmacol.*, v. 50, p. 735-741, 1995.
- SCHULZE-OSTHOFF, K., BAUER, M. K. A., VOGT, M., WESSELBORG, S. Oxidative stress and signal transduction. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, v. 67, p. 336-342, 1997.
- SCHWARTZ, J. L. *In vitro* biological methods for determination of carotenoid activity. *Methods in Enzymol.*, v. 214, p. 226-256, 1994.
- SCHWARTZ, J., SHKLAR, G. Regression of experimental oral carcinomas by local injection of β -carotene and canthaxanthin. *Nutr. Cancer*, v. 11, p. 35-40, 1988.
- SCHWARTZ, J., SHKLAR, G. The selective cytotoxic effect of carotenoids and α -tocopherol on human cancer cell lines *in vitro*. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 50, p. 367-373, 1992.
- SCHWARTZ, J., SUDA, D., LIGHT, D. Beta-carotene is associated with the regression of hamster buccal pouch carcinoma and the induction of tumor necrosis factor in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 136, p. 1130-1135, 1986.
- SCHWARTZ, J., SHKLAR, G., REID, S., TRICKLER, D. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae. *Nutr. Cancer*, v. 11, p. 127-34, 1988.
- SCHWARTZ, J. L., SINGH, R. P., TEICHER, B., WRIGHT, J. E., TRITES, D. H., SHKLAR, G. Induction of a 70 kD protein associated with the selective cytotoxicity of beta-carotene in human epidermal carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 169, p. 941-946, 1990.
- SCHWARTZ, J. L., FLYNN, E., TRICKLER, D., SHKLAR, G. Directed lysis of experimental cancer by β -carotene in liposomes. *Nutr. Cancer*, v. 16, p. 107-124, 1991.
- SCHWARTZ, J., TANAKA, J., KHANDEKAR, V., HERMAN, T. S., TEICHER, B. A. Beta-carotene and/or vitamin E as modulator of alkylating agents in SCC-25 human squamous carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, v. 29, p. 207-213, 1992.
- SCHWARTZ, J. L., ANTONIADES, D. Z., ZHAO, S. Molecular and biochemical reprogramming of oncogenesis through the activity of prooxidants and antioxidants. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 686, p. 262-279, 1993.
- SCOTT, R. E. Differentiation, differentiation/gene therapy and cancer. *Pharmacol. Ther.*, v. 73, p. 51-65, 1997.
- SCRABLE, H. J., SAPIENZA, C., CAVENEE, W. K. Genetic and epigenetic losses of heterozygosity in cancer predisposition and progression. *Adv. Cancer Res.*, v. 54, p. 25-62, 1990.

- SEIFTER, E., RETTURA, G., PADAWER, J., STRATTFORD, F., GOODWIN, P., LEVINSON, S. M. Regression of C3HBA mouse tumor due to x-ray therapy combined with supplementary beta-carotene or vitamin A. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 68, p. 409-417, 1981.
- SEIFTER, E., RETTURA, G., PADAWER, J., LEVINSON, S. M. Moloney murine sarcoma virus tumors in CBA/J mice: Chemopreventive and chemotherapeutic actions of supplemental beta-carotene. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 71, p. 835-840, 1982.
- SEIFTER, E., RETTURA, G., LEVINSON, S. M. Supplemental beta-carotene (BC): Prophylactic action against 7,12 dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA) carcinogenesis. *Fed. Proc.*, v. 43, p. 662, 1984.
- SELL, S. Distribution of alphafetoprotein and albumin containing cells in the livers of Fischer rats fed four cycles of N-2-fluorenylacetamide. *Cancer Res.*, v. 38, p. 3107-3113, 1978.
- SELL, S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res.*, v. 50, p. 3811-3815, 1990.
- SELL, S., DUNSFORD, H. A. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Amer. J. Pathol.*, v. 134, p. 1347-1363, 1989.
- SELL, S., LEFFERT, H. An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, v. 2, p. 67-78, 1982.
- SELL, S., PIERCE, G. B. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab. Invest.*, v. 70, p. 6-22, 1994.
- SELLS, M. A., KAYTAL, S. R., SELL, S., SHINOZUKA, H., LOMBARDI, B. Induction of foci of altered γ glutamyltranspeptidase-positive hepatocytes in carcinogen-treated rats fed a choline-deficient diet. *Br. J. Cancer*, v. 40, p. 274-283, 1979.
- SEMPLE-ROBERTS, E., HAYES, M. A., ARMSTRONG, D., BECKER, R. A., RACZ, W. J., FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. *Int. J. Cancer*, v. 40, p. 643-645, 1987.
- SEN, C. K., PARCKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.*, v. 10, p. 709-720, 1996.
- SHAMBERGER, R. J. Inhibitory effect of vitamin A on carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 47, p. 667-672, 1971.
- SHAPIRO, S. S., MOTT, D. J., MACHLIN, L. J. Kinetic characteristics of beta-carotene uptake and depletion in rat tissue. *J. Nutr.*, v. 114, p. 1924-1933, 1984.
- SHARMA, R. V., MATHUR, S. N., DIMITROVSKII, A. A., DAS, R. C., GANGULY, J. Studies on the metabolism of β -carotene and apo- β -carotenoids in rats and chickens. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 486, p. 183-194, 1977.
- SHARMA, S., STUTZMAN, J. D., KELLOFF, G. J., STEELE, V. E. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 54, p. 5848-5855, 1994.
- SHAW, J. *The Cure of Cancer: and How Surgery Blocks the Way*. London: Turney, 1907.

- SHEKELLE, R. B., LIU, S., RAYNOR JR., W. J., LEPPER, M., MALIZA, C., ROSSOF, A. H. Dietary vitamin A and risk of cancer in the Western Electric Study. *Lancet*, v. 2, p. 1185-1189, 1981.
- SHKLAR, G., SCHWARTZ, J. L. Tumor necrosis factor in experimental cancer: regression with alpha tocopherol, beta-carotene, and algae extract. *Eur. J. Cancer Oncol.*, v. 24, p. 839-850, 1988.
- SHKLAR, G., SCHWARTZ, J. Oral cancer inhibition by micronutrients. The experimental basis for clinical trials. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer*, v. 29B, p. 9-16, 1993.
- SHKLAR, G., SCHWARTZ, J. A common pathway for the destruction of cancer cells: experimental evidence and clinical implications. *Int. J. Oncol.*, v. 4, p. 215-224, 1994.
- SHKLAR, G., SCHWARTZ, J., TRICKLER, D., REID, S. Regression of experimental cancer by oral administration of combined α -tocopherol and β -carotene. *Nutr. Cancer*, v. 12, p. 321-325, 1989.
- SHUBIK, P. The growth potentialities of induced skin tumors in mice. The effects of different methods of chemical carcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 10, p. 713-717, 1950.
- SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 62, p. 1315S-1321S, 1995.
- SIES, H., STAHL, W. Carotenoids and intercellular communication via gap junctions. *Internat. J. Vitam. Nutr. Res.*, v. 67, p. 364-367, 1997.
- SIGAL, S. H., BRILL, S., FIORINO, A. S., REID, L. M. The liver as a stem cell and lineage system. *Am. J. Physiol.*, v. 263, p. G139-G148, 1992.
- SILVEIRA, E. R. Efeito das administrações de vitamina A e dos ácidos retinóicos *trans* e *cis* em ratos Wistar na etapa de progressão de modelo de hepatocarcinogênese. São Paulo, 97 p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo], 1998.
- SILVEIRA, E. R., MORENO, F. S. Natural retinoids and β -carotene: from food to their actions on gene expression. *J. Nutr. Biochem.*, v. 9, p. 446-456, 1998.
- SKLAN, D. Carotene cleavage activity in the corpus luteum of cattle. *Int. J. Vitamin. Nutr. Res.*, v. 53, p. 23-26, 1983.
- SLAGA, T. J. Inhibition of skin tumor initiation, promotion, and progression by antioxidants and related compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 35, p. 51-57, 1995.
- SMELAND, S., BJERKNES, T., MALABA, L., ESKILD, W., NORUM, K. R., BLOMHOFF, R. Tissue distribution of the receptor for plasma retinol-binding protein. *Biochem. J.*, v. 305, p. 419-424, 1995.
- SMITH, P. G., JICK, H. Cancers among users of preparations containing vitamin A: a case-control investigation. *Cancer*, v. 42, p. 808-811, 1978.
- SMITH, S. S. DNA methylation in eukaryotic chromosome stability. *Mol. Carcinog.*, v. 4, p. 91-92, 1991.
- SMUCKLER, E. A. Chemicals, cancer and cancer biology. *West. J. Med.*, v. 139, p. 55-74, 1983.

- SOLOMONS, N. W., BULUX, J. Effects of nutritional status on carotene uptake and bioconversion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 691, p. 96-109, 1993.
- SOLT, D. T., FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, v. 263, p. 702-703, 1976.
- SOLT, D. B., CAYAMA, E., TSUDA, H., ENOMOTO, K., LEE, G., FARBER, E. Promotion of liver cancer development by brief exposure to dietary 2-acetylaminofluorene plus partial hepatectomy or carbon tetrachloride. *Cancer Res.*, v. 43, p. 178-181, 1983.
- SOM, S., CHATTERJEE, M., BANNERJEE, M. R. Beta-carotene inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced transformation of murine mammary cells *in vitro*. *Carcinogenesis*, v. 5, p. 937-940, 1984.
- SOMA, M. R., CORSINI, A., PAOLETTI, R. Cholesterol and mevalonic acid modulation in cell metabolism and multiplication. *Toxicol. Lett.*, v. 64/65, p. 1-15, 1992.
- SOPRANO, D. R., SOPRANO, K. J., GOODMAN, D. S. Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J. Lipid Res.*, v. 27, p. 166-171, 1986.
- SORENSEN, C. M., BARRY, M. A., EASTMAN, A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 82, p. 749-755, 1990.
- SOUTHERN, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, v. 98, p. 503-517, 1975.
- SPORN, M. B., DUNLOP, N. M., NEWTON, D. L., SMITH, J. M. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed. Proc.*, v. 35, p. 1332-1338, 1976.
- SPORN, M. B., ROBERTS, A. B., GOODMAN, D. S., eds. *The Retinoids: biology, chemistry, and medicine*, 2nd ed. Raven Press, New York, p. 1-679, 1994.
- SQUIRE, R. A., LEVITT, M. H. Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. *Cancer Res.*, v. 35, p. 3214-3223, 1975.
- STÄHELIN, H. B., GEY, K. F., EICHHOLZER, M., LÜDIN, E. β -Carotene and cancer prevention: the Basel study. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 53, p. 265S-269S, 1991.
- STAHL, W., SIEHS, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J. Nutr.*, v. 122, p. 2161-2166, 1992.
- STAHL, W., SCHWARZ, W., SUNDQUIST, A. R., SIES, H. *Cis-trans* isomers of lycopene and β -carotene in human serum and tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 294, p. 173-177, 1992.
- STAHL, W., SCHWARTZ, W., VON LAAR, J., SIES, H. All-*trans* β -carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the 9-*cis* geometrical isomer. *J. Nutr.*, v. 125, p. 2128-2133, 1995.
- STAHL, W., NICOLAI, S., BRIMBA, K., HANUSCH, M., BROSZEIT, G., PETERS, M., MARTIN, H.-D., SIES, H. Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 89-92, 1997.

- STATLAND, B. E. Nutrition and cancer. *Clin. Chem.*, v. 38, p. 1587-1594, 1992.
- STARK, A. A., RUSSELL, J. J., LANGENBACH, R., PAGANO, D. A., ZEIGER, E., HUBERMAN, E. Localization of oxidative damage by a glutathione-gamma-glutamyl transpeptidase system in preneoplastic lesions in sections of livers from carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis*, v. 15, p. 343-348, 1994.
- STEER, C. J. Liver regeneration. *FASEB J.*, v. 9, p. 1396-1400, 1995.
- STEINEL, H. H., BAKER, R. S. U. Effects of β -carotene on chemically-induced skin tumors in HRA/Skh hairless mice. *Cancer Lett.*, v. 51, p. 163-168, 1990.
- STICH, H. F., DUNN, B. P. Relationship between cellular levels of β -carotene and sensitivity to genotoxic agents. *Int. J. Cancer*, v. 38, p. 713-717, 1986.
- STICH, H. F., ROSIN, M. P. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. *Cancer Lett.*, v. 22, p. 241-253, 1984.
- STICH, H. F., ROSIN, M. P., VALLEJERA, M. O. Reduction with vitamin A and beta-carotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosal cells in asian betel nut and tobacco chewers. *Lancet*, v. i, p. 1204-1206, 1984a.
- STICH, H. F., STICH, W., ROSIN, M. P., VALLEJERA, M. O. Use of the micronucleus test to monitor the effect of vitamin A, beta-carotene and canthaxanthin on the buccal mucosa of betel nut/tobacco chewers. *Int. J. Cancer*, v. 34, p. 745-750, 1984b.
- STICH, H. F., HORNBY, A. P., MATHEW, B., SANKARANARAYANAN, R., KRISHMAN NAIR, M. Response of oral leukoplakias to the administration of vitamin A. *Cancer Lett.*, v. 40, p. 93-101, 1988a.
- STICH, H. F., ROSIN, M. P., HORNBY, A. P., MATHEW, B., SANKARANARAYANAN, R., KRISHMAN NAIR, M. K. Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *Int. J. Cancer*, v. 42, p. 195-199, 1988b.
- STICH, H. F., MATHEW, B., SANKARANARAYANAN, R., KRISHMAN NAIR, M. Remission of precancerous lesions of the oral cavity of tobacco chewers and maintenance of the protective effect of beta-carotene or vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 53, p. 298S-304S, 1991.
- STOCKS, P. Cancer incidence in North Wales and Liverpool region in relation to habits and environment. *British Empire Cancer Campaign 35th Ann. Report*, v. 2, p. 1-127, 1933.
- STONER, G. D., MORSE, M. A., KELLOFF, G. J. Perspectives in cancer chemoprevention. *Environ. Health Perspect.*, v. 105, p. 945-954, 1997.
- SUDA, D., SCHWARTZ, J., SKHLAR, G. Inhibition of experimental oral carcinogenesis by topical beta-carotene. *Carcinogenesis*, v. 7, p. 711-715, 1986.
- SUGITANI, S., SAKAMOTO, M., ICHIDA, T., GENDA, T., ASAKURA, H., HIROHASHI, S. Hyperplastic foci reflect the risk of multicentric development of human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, v. 28, p. 1045-1053, 1998.

- SUN, X., SHIMIZU, H., YAMAMOTO, K. -I. Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, v. 15, p. 4489-4496, 1995.
- SWISSELM, K., RYAN, K., LEE, X., TSOU, H. C., PEACOCKE, M., SAGER, R. Down-regulation of retinoic acid receptor β in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth & Differ.*, v. 5, p. 133-141, 1994.
- SZYF, M., MEISELS, E., RAZIN, A. Biological role of DNA methylation: sequence-specific single-strand breaks associated with hypomethylation of GATC sites in *Escherichia coli* DNA. *J. Bacteriol.*, v. 168, p. 1487-1490, 1986.
- TAMAI, H., MORINOBU, T., MURATA, T., MANAGO, M., MINO, M. 9-*cis* β -Carotene in human plasma and blood cells after ingestion of β -carotene. *Lipids*, v. 30, p. 493-498, 1995.
- TANAKA, T., MAKITA, H., OHNISHI, M., HIROSE, Y., WANG, A., MORI, H., SATOH, K., HARA, A., OGAWA, H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of β -carotene. *Cancer Res.*, v. 54, p. 4653-4659, 1994.
- TANG, G. -W., WANG, X. -D., RUSSELL, R. M., KRINSKY, N. I. Characterization of β -apo-13-carotenone and β -apo-14'-carotenal as enzymatic products of the excentric cleavage of β -carotene. *Biochemistry*, v. 30, p. 9829-9834, 1991.
- TANNENBAUM, A. Relationship of body weight to cancer incidence. *Archs. Path.*, v. 30, p. 509-517, 1940.
- TANNENBAUM, A. The genesis and growth of tumors. II. Effects of caloric restriction per se. *Cancer Res.*, v. 2, p. 460-467, 1942a.
- TANNENBAUM, A. The genesis and growth of tumors. III. Effects of a high-fat diet. *Cancer Res.*, v. 2, p. 468-474, 1942b.
- TARSETTI, F., LENZI, R., SALVE, R., SCHULER, E., RIJHSINGHANI, K., LENZEN, R., TAVOLINI, N. Liver carcinogenesis associated with feeding of ethionine in a choline-free diet: evidence against a role of oval cells in the emergence of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, v. 18, p. 596-603, 1993.
- TATEMATSU, M., NAGAMINE, Y., FARBER, E. Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res.*, v. 43, p. 5049-5058, 1983.
- TEE, E. -S., LIM, C. -L., CHONG, Y. -H., KHOR, S. -C. A study of the biological utilization of carotenoids of carrot and swamp cabbage in rats. *Food Chem.*, v. 56, p. 21-32, 1996.
- TEE, L. B. G., KIRILAK, Y., HUANG, W. -H., SMITH, P. G. J., MORGAN, R. H., YEOH, G. C. T. Dual phenotypic expression of hepatocytes and bile ductular markers in developing and preneoplastic rat liver. *Carcinogenesis*, v. 17, p. 251-259, 1996.
- TEMPLE, N. J., BASU, T. K. Protective effect of β -carotene against colon tumors in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 78, p. 1211-1214, 1987.
- THANE, C., REDDY, S. Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. *Nutr. Food Sci.*, v. 2, p. 58-65, 1997.

- THE ALPHA TOCOPHEROL, BETA-CAROTENE CANCER PREVENTION STUDY GROUP. The effects of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.*, v. 330, p. 1029-1035, 1994.
- TOBA, T., SHIDOJI, Y., FUJII, J., MORIWAKI, H., MUTO, Y., SUZUKI, T., OHISHI, N., YAGI, K. Growth suppression and induction of heat-shock protein-70 by 9-cis beta-carotene in cervical dysplasia-derived cells. *Life Sci.*, v. 61, p. 839-845, 1997.
- TOMATIS, L. Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on an IARC workshop report. International Agency for Research on Cancer. *Environ. Health Perspect.*, v. 101, p. 149-151, 1993.
- TOMITA, Y., HIMENO, K., NOMOTO, K., ENDO, H., HIROHATA, T. Augmentation of tumor immunity against syngenic tumors in mice by β -carotene. *J. Natl. Cancer. Inst.*, v. 78, p. 679-680, 1987.
- TRABER, M. G., DIAMOND, S. R., LANE, J. C., BRODY, R. I., KAYDEN, H. J. β -Carotene transport in human lipoproteins. Comparisons with α -tocopherol. *Lipids*, v. 29, p. 665-669, 1994.
- TRAVIS, C. C., BELEFANT, H. Promotion as a factor in carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, v. 60, p. 1-9, 1992.
- TRIGUEIRO, I. N. S., PENTEADO, M. D. V. C. Teores de alfa e beta-caroteno e atividades pró-vitáminica A de óleos de dendê brasileiros. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, v. 28, p. 61-74, 1992.
- TSUDA, H., UEHARA, N., IWAHORI, Y., ASAMOTO, M., IIGO, M., NAGAO, M., MATSUMOTO, K., ITO, M., HIRONO, I. Chemopreventive effects of beta-carotene, alpha-tocopherol and five naturally occurring antioxidants on initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 85, p. 1214-1219, 1994.
- TSUJII, M., DUBOIS, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, v. 83, p. 493-501, 1995.
- TZEN, C.-Y., ESTERVIG, D. N., MINOO, P., FILIPAK, M., MAERCKLEIN, P. B., HOERL, B. J., SCOTT, R. E. Differentiation, cancer, and anticancer activity. *Biochem. Cell. Biol.*, v. 66, p. 479-489, 1988.
- UEDA, N., SHAH, S. Apoptosis. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 124, p. 169-177, 1994.
- UEHARA, N., IWAHORI, Y., ASAMOTO, M., BABA-TORIYAMA, H., IIGO, M., OCHIAI, M., NAGAO, M., NAKAYAMA, M., DEGAWA, M., MATSUMOTO, K., HIRONO, I., BEPPU, H., FUJITA, K., TSUDA, H. Decreased levels of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-DNA-adducts in rats treated with beta-carotene, alpha-tocopherol and freeze-dried aloe. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 87, p. 342-348, 1996.
- ULRICH, A., SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, v. 61, p. 203-212, 1990.
- URIEL, J. Cancer, redifferentiation, and the myth of Faust. *Cancer Res.*, v. 36, p. 4269-4275, 1976.
- USHIJIMA, T., MORIMURA, K., HOSOYA, Y., OKONOGLI, H., TATEMATSU, M., SUGIMURA, T., NAGAO, M. Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 2284-2289, 1997.

- VAN DEN HEUVEL, S., HARLOW, E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science*, v. 262, p. 2050-2054, 1993.
- VAN LIESHOUT, E. M. M., PETERS, W. H. M., JANSEN, J. B. M. J. Effect of oltipraz, α -tocopherol, β -carotene and phenethylisothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. *Carcinogenesis*, v. 17, p. 1439-1445, 1996.
- VAN POPPEL, G., GOLDBOHN, R. A. Epidemiological evidence for β -carotene and cancer prevention, *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 62, p. 1393S-1402S, 1995.
- VAN POPPEL, G., KOK, F. J., HERMUS, R. J. Beta-carotene supplementation in smokers reduces the frequency of micronuclei in sputum. *Br. J. Cancer*, v. 66, p. 1164-1168, 1992.
- VAN VLIET, T. Absorption of β -carotene and other carotenoids in humans and animal models. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 50, p. S32-S37, 1996.
- VAN VLIET, T., VAN VLISSINGEN, M. F., VAN SCHAIK, F., VAN DEN BERG, H. Beta-carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. *J. Nutr.*, v. 126, p. 499-508, 1996.
- VARMUS, H. An historical overview of oncogenes. In: *Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer*, R. A. Weinberg, ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 3-44, 1989.
- VENITT, S. Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer. *Clin. Chem.*, v. 40, p. 1421-1425, 1994.
- XU, X. -C., RO, J. Y., LEE, J. S., SHIN, D. M., HONG, W. K., LOTAN, R. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues. *Cancer Res.*, v. 54, p. 3580-3587, 1994.
- XU, X. -C., SNEIGE, N., LIU, X., NANDAGIRI, R., LEE, J. J., LUKMANJI, F., HORTOBAGYI, G., LIPPMAN, S. M., DHINGRA, K., LOTAN, R. Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor β messenger RNA level during breast carcinogenesis. *Cancer Res.*, v. 57, p. 4992-4996, 1997.
- WALD, G. The visual functions of the vitamins A. *Vitam. & Horm.*, v. 18, p. 417-430, 1960.
- WALKER, M. R., RAPLEY, R. Oncogenes and the molecular basis of cancer. *Route Maps In Gene Technology*, Oxford, Blackwell Science Ltd., p. 250-253, 1997.
- WAN, Y. J., WANG, L., WU, T. C. Expression of retinoic acid receptor genes in developing rat livers and hepatoma cells. *Lab. Invest.*, v. 66, p. 646-651, 1992.
- WANG, X. -D. Review: absorption and metabolism of β -carotene. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 13, p. 314-325, 1994.
- WANG, X. -D., TANG, G. -W., FOX, J. G., KRINSKY, N. I., RUSSEL, R. M. Enzymatic conversion of β -carotene into β -apo-carotenals and retinoids by human, monkey, ferret, and rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 285, p. 8-16, 1991.
- WANG, X. -D., KRINSKY, N. I., RUSSELL, R. M. Retinoic acid regulates retinol metabolism via feedback inhibition of retinol oxidation and stimulation of retinol esterification in ferret liver. *J. Nutr.*, v. 123, p. 1277-1285, 1993.

- WANG, X. -D., KRINSKY, N. I., BENOTTI, P. N., RUSSELL, R. M. Biosynthesis of 9-cis retinoic acid from 9-cis β -carotene in human intestinal mucosa in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 313, p. 150-155, 1994.
- WANG, W., HIGUCHI, C. M. Induction of NAD(P)H:quinone reductase by vitamins A, E and C in Colo205 colon cancer cells. *Cancer Lett.*, v. 98, p. 63-69, 1995 [errata em *Cancer Lett.*, v. 101, p. 265], 1996.
- WARRELL JR., R. P., DE THE, H., WANG, Z. -Y., DEGOS, L. Acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, v. 329, p. 177-189, 1993.
- WASSERMAN, W. W., FAHL, W. E. Functional antioxidant responsive elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 94, p. 5361-5366, 1997.
- WATTENBERG, L. W. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res.*, v. 2448s-2453s, 1983.
- WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.*, v. 45, p. 1-8, 1985.
- WATTENBERG, L. W. Inhibition of carcinogenesis by minor anutrient constituents of the diet. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 49, p. 173-183, 1990.
- WATTENBERG, L. W. Inhibition of tumorigenesis in animals. *IARC Sci. Publ.*, v. 139, p. 151-158, 1996.
- WATTENBERG, L. W. An overview of chemoprevention: current status and future prospects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 216, p. 133-141, 1997.
- WEINSTEIN, I. B. The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Res.*, v. 48, p. 4135-4143, 1988.
- WEISBURGER, J. H., RAINERI, R. Dietary factors and the etiology of gastric cancer. *Cancer Res.*, v. 35, p. 3469-3474, 1975.
- WEITBERG, A. B., WEITZMAN, S. A., CLARK, E. P., STOSSEL, T. P. Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J. Clin. Invest.*, v. 75, p. 1835-1841, 1985.
- WHITE, W. S., PECK, K. M., BIERER, T. L., GUGGER, E. T., ERDMAN, J. W. Interactions of oral β -carotene and canthaxanthin in ferrets. *J. Nutr.*, v. 123, p. 1405-1413, 1993.
- WILLIAMS, G. M. The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 605, p. 167-189, 1980.
- WILLIAMS, W. *The Natural History of Cancer, with Special Reference to its Causation and Prevention*. London: Heinemann, 1908.
- WILSON, M. J., SHIVAPURKAR, N., POIRIER, L. A. Hypomethylation of hepatic nuclear DNA in rats fed with a carcinogenic methyl-deficient diet. *Biochem. J.*, v. 218, p. 987-990, 1984.
- WINGERATH, T., STAHL, W., SIES, H. β -Cryptoxanthin selectively increases in human chylomicrons upon ingestion of tangerine concentrate rich in β -cryptoxanthin esters. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 324, p. 385-390, 1995.
- WISEMAN, R. *Several Chirurgical Treatises*. London: Flesher & Maccock.

- WOLBACH, S. B., HOWE, P. R. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A-vitamin. *J. Exp. Med.*, v. 42, p. 753-778, 1925.
- WOLF, G. The intracellular vitamin A-binding proteins: an overview of their functions. *Nutr. Rev.*, v. 49, p. 1-11, 1991.
- WOLF, G. The enzymatic cleavage of β -carotene: still controversial. *Nutr. Rev.*, v. 53, p. 134-137, 1995.
- WOLF, G. A history of vitamin A and retinoids. *FASEB J.*, v. 10, p. 1102-1107, 1996.
- WORLD CANCER RESEARCH FOUNDATION/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Introduction. In: *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*, p. 13-17, 1997a.
- WORLD CANCER RESEARCH FOUNDATION/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Patterns of cancer. In: *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*, p. 35-52, 1997b.
- WORLD CANCER RESEARCH FOUNDATION/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Liver. In: *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*, p. 202-214, 1997c.
- WORLD CANCER RESEARCH FOUNDATION/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Prevention and its benefits. In: *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*, p. 538-548, 1997d.
- WORLD CANCER RESEARCH FOUNDATION/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Vitamins. In: *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*, p. 404-416, 1997e.
- WOUTERSEN, R. A., VAN GARDEREN-HOETMER, A. Inhibition of dietary fat promoted development of (pre)neoplastic lesions in exocrine pancreas of rats and hamsters by supplemental selenium and β -carotene. *Cancer Lett.*, v. 42, p. 79-85, 1988.
- WU, T. -S., MORENO, F. S. Carcinogênese hepática. In: *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia e Anestesia*. O. CASTRO E SILVA Jr., A. BEER Jr., S. ZUCOLOTO, eds. Robe Editorial, cap. 70, p. 698-705, 1998.
- WYNDER, E., GORI, G. Contribution of the environment to cancer incidence: an epidemiological exercise. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 58, p. 825-832, 1977.
- WYNDER, E. L., SHIGEMATSU, T. Environmental factors of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, v. 20, p. 1520-1561, 1967.
- YAMAGIWA, K., ICHIKAWA, K. Experimentelle Studie über die Pathogenese der Epithelialgeschwülste. *Mitt. Med. Fak. Tokio*, v. 15, p. 295, 1915.
- YAMAGIWA, K., ICHIKAWA, K. Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *J. Cancer Res.*, v. 3, p. 1-21, 1918.
- YOKOTA, J., SUGIMURA, T. Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *FASEB J.*, v. 7, p. 920-925, 1993.
- YOKOYAMA, S., SELLS, M. A., REDDY, T. V., LOMBARDI, B. Hepatocarcinogenesis and promoting action of a choline-devoid diet in the rat. *Cancer Res.*, v. 45, p. 2834-2842, 1985.

- YONISH-ROUACH, E., RESNITZKY, D., LOTEM, J., SACHS, L., KIMCHI, A., OREN, M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, v. 352, p.345-347, 1991.
- YOU, C. -S., PARKER, R. S., GOODMAN, K. J., SWANSON, J. E., CORSO, T. N. Evidence of *cis-trans* isomerization of 9-*cis*- β -carotene during absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 64, p. 177-183, 1996.
- YOUNGMAN, L. D., CAMPBELL, T. C. Inhibition of aflatoxin B1 - induced gamma glutamyltranspeptidase positive (GGT +) hepatic preneoplastic foci and tumors by low protein diets: evidence that altered GGT + foci indicate neoplastic potential. *Carcinogenesis*, v. 13, p. 1607-1613, 1992.
- YUSPA, S. H. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis — thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.*, v. 54, p. 1178-1189, 1994.
- ZACARIAS, W. Methylation of cytosine influences the DNA structure. In: *DNA methylation: molecular biology and biological significance*. J. P. JOST, H. P. SALUZ, eds. Birkhäuser Verlag, Basel, p. 27-38, 1993.
- ZAPISEK, W. F., CRONIN, G. M., LYN-COOK, B. D., POIRIER, L. A. The onset of oncogene hypomethylation in the livers of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis*, v. 13, p. 1869-1872, 1992.
- ZECHMEISTER, L., DEUEL Jr., H. J., INHOFFEN, H. H., LEEMANN, J., GREENBERG, S. M., GANGULY, J. Stereochemical configuration and provitamin A activity. X. A comparison of synthetic 15,15'-monocis- β -carotene (central monocis- β -carotene) with all-*trans*- β -carotene in the rat and chick. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 36, p. 80-88, 1952.
- ZEISEL, S. H., DA COSTA, K. A., ALBRIGHT, C. D., SHIN, O. H. Choline and hepatocarcinogenesis in the rat. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 375, p. 65-74, 1995.
- ZENG, S., FURR, H. C., OLSON, J. A. Metabolism of carotenoid analogs in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 56, p. 433-439, 1992.
- ZERBAN, H., RADIG, S., KOPP-SCHNEIDER, A., BANNASCH, P. Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability. *Carcinogenesis*, v. 15, p. 2467-2473, 1994.
- ZHANG, L. -X., COONEY, R. V., BERTRAM, J. S. Carotenoids up-regulate connexin 43 expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res.*, v. 52, p. 5707-5712, 1992.
- ZHANG, L. -X., ACEVEDO, P., GUO, H., BERTRAM, J. S. Upregulation of gap junctional communication and connexin 43 expression by carotenoids in human dermal fibroblasts but not in human keratinocytes. *Mol. Carcinogenesis*, v. 12, p. 50-58, 1995.
- ZHANG, X. -K., LIU, Y., LEE, M. -O., PFAHL, M. A. A specific defect in the retinoic acid response associated with human lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, v. 54, p. 5663-5669, 1994.
- ZHANG, X. -K., LIU, Y., LEE, M. O. Retinoid receptors in human lung cancer and breast cancer. *Mutat. Res.*, v. 350, p. 267-277, 1996.
- ZHENG, Y., KRAMER, P. M., OLSON, G., LUBET, R. A., STEELE, V. E., KELOFF, G. J., PEREIRA, M. A. Prevention by retinoids of azoxymethane-induced tumors and aberrant crypt foci and their modulation of cell proliferation in the colon of rats. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 2119-2125, 1997.

- ZHOU, H., MANJI, S. S., FINDLAY, D. M., MARTIN, T. J., HEATH, J. K., NG, K. W. Novel action of retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 22433-22439, 1994.
- ZHU, W.-Y., JONES, C. S., KISS, A., MATSUKUMA, K., AMIN, S., DE LUCA, L. M. Retinoic acid inhibition of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp. Cell Res.*, v. 234, p. 293-299, 1997.
- ZIEGLER, R. G. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 53, p. 251S-259S, 1991.
- ZIEGLER, R. G., SUBAR, A. F., CRAFT, N. E., URSIN, G., PATTERSON, B. H., GRAUBARD, B. I. Does β -carotene explain why reduced cancer risk is associated with vegetable and fruit intake? *Cancer Res.*, v. 52, p. 2060S-2066S, 1992.
- ZIEGLER, R. G., MAYNE, S. T., SWANSON, C. A. Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes & Control*, v. 7, p. 157-177, 1996a.
- ZIEGLER, R. G., COLAVITO, E. A., HARTGE, P., MCADAMS, M. J., SCHOENBERG, J. B., MASON, T. J., FRAUMENI JR., J. F. Importance of α -carotene, β -carotene and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.*, v. 88, p. 612-615, 1996b.
- ZINGG, J. -M., JONES, P. A. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 18, p. 869-882, 1997.

SUMMARY

EFFECTS OF β -CAROTENE AND VITAMIN A ADMINISTRATION IN WISTAR RATS AT THE PROGRESSION PHASE OF THE "RESISTANT HEPATOCYTE" MODEL OF HEPATOCARCINOGENESIS

In this study the effects of β -carotene and vitamin A administration in pre-neoplastic and neoplastic lesions, on cell proliferation and on the methylation pattern of the proto-oncogenes *c-Ha-ras* and *c-myc*, as well as on the gene for HMGCoA reductase, were evaluated in Wistar rats at the progression phase of hepatocarcinogenesis. For this purpose the animals were submitted to the "resistant hepatocyte" model, i. e., to an injection of diethylnitrosamine (DEN) as an initiating carcinogen, followed by the administration of 2-acetaminofluorene and by a partial hepatectomy. Ten months after DEN injection, three different groups of experimental animals received by gavage, every other day and for eight consecutive weeks, β -carotene (7 mg/100 g B.W.), vitamin A (1 mg/100 g B.W.) or corn oil (controls), respectively. Afterwards, the animals were killed. An hour before the sacrifice each one received 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrDU; 10 mg/100 g B.W.) in order to evaluate cell proliferation. The macroscopic observation of the liver showed that β -carotene and vitamin A reduced cancer incidence (25%) in comparison to the control group (65%), although only the retinoid reduced simultaneously both the incidence and total number of persistent nodules of hepatocytes. These results were confirmed by standard histopathological examination (H&E) of the liver sections. The morphometry of γ GT-positive preneoplastic lesions did not show significant differences between the different experimental groups. However, β -carotene and vitamin A administration reduced cell proliferation both in liver lesions (persistent nodules/cancers) and in surrounding tissues. Hypomethylation of *c-myc* and HMGCoA reductase genes were observed in persistent nodules of hepatocytes as well as in cancers, although it had not been influenced by the carotenoid or retinoid treatment. β -Carotene administration increased the hepatic concentrations of the carotenoid, but not of retinol. Together, these results indicate the existence of an intrinsic activity of β -carotene, independent of its function as a provitamin A. Moreover, the data suggest that both the carotenoid and the retinoid have inhibitory actions on neoplastic lesions when administered during the progression phase of hepatocarcinogenesis. These activities could eventually involve an inhibition on cell proliferation, but not an action on the DNA methylation process.