

Simone Morais Palmeira

**Mecanismos da ação quimiopreventiva do óleo de pequi (*Caryocar
brasilense* Camb) na hepatocarcinogênese *in vitro***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutora em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier
Hernandez Blazquez

**São Paulo
2022**

Simone Morais Palmeira

**Mecanismos da ação quimiopreventiva do óleo de pequi (*Caryocar
brasilense* Camb) na hepatocarcinogênese *in vitro***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutora em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier
Hernandez Blazquez

**São Paulo
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Palmeira, Simone Morais
Mecanismos da ação quimiopreventiva do óleo de
pequi (Caryocar brasiliense Camb) na
hepatocarcinogênese in vitro / Simone Morais
Palmeira. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Francisco Javier Hernandez Blázquez.

Descritores: 1.Caryocar brasiliense
2.Antioxidantes 3.Quimioprevenção 4.Carcinogênese
5.Fígado 6.Aflatoxina B1

USP/FM/DBD-261/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A Raimundo C. Palmeira, meu amado pai (in memoriam) que tinha o maior prazer em comemorar nossas conquistas acadêmicas.

Agradecimientos

Agradecimentos

“Eu vi em campo aberto se erguer construção... e foi com muitas mãos. E ao olhar para trás, tudo que passou, venho agradecer quem comigo estava.” P. Valença

Ao orientador, Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez por todos esses anos de orientação com seriedade, competência e muita paciência. Obrigada pela autonomia que me destes em relação a esse trabalho e a confiança depositada em mim.

À Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Zaidan Dagli, por ter disponibilizado seu laboratório sem alguma restrição. Agradeço sua imensa simpatia.

Ao professor Dr. Bruno Cogliati, por ceder seu laboratório para as leituras no leitor de microplacas de fluorescência.

Ao Prof. Dr. César Koppe Grisolia da Universidade de Brasília - UnB, por ter nos cedido o óleo de Pequi.

À Dra. Marcia Kazumi Nagamini, pelo treinamento no cultivo celular e suporte durante todas as avaliações deste trabalho.

À Dra. Ivone I. Mackowiak da Fonseca, pelo auxílio com as análises de *western blotting*.

Ao colega de laboratório e amigo Rennan Olio, pelo auxílio com as imunofluorescências e pelo companheirismo nestes anos de LAMIH.

Ao Tulio Teruo Yoshinaga, colega da pós-graduação pelo auxílio com as análises no citômetro de fluxo.

Aos técnicos, Diogo Palermo (LAMIH) e Maurício (Laboratório de Oncologia Experimental) pelo suporte indispensável.

Algumas pessoas especiais que de forma não direta, mas indispensável, colaboraram para o resultado deste trabalho, também agradeço a eles:

Aos colegas de laboratório, Juliana S. Ferrão, Andrea Midory, Gabriela F Toledo e Tatícia Ikeda pela vivência agradável e acolhimento nos anos do doutoramento.

À família, especialmente meus amores Maurício e Alice. Por toda colaboração e compreensão nos períodos críticos da realização deste trabalho.

À minha família de coração, Ana Albuquerque, Cristiane Castilho, Kamilla Sampaio, Greta Huamanrayme e Rina H. Bustamanteserem por serem a rede de apoio a essa mãe.

A finalização deste trabalho é resultado das horas que vocês se doaram para estar com minha filha, nossa Pituquinha, enquanto eu realizava algum experimento ou redação da tese. Grata pelo amor e presença de vocês nas nossas vidas.

A Deus por ter me conduzido até este momento, colocando as pessoas certas no meu caminho. A Ele toda honra.

Apoio financeiro

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2016/01149-6) pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Figuras	12
Lista de siglas	13
Resumo	14
1 Introdução.....	17
2 Objetivos.....	26
3 Métodos	28
3. 1 Preparo e análise química do óleo do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb)	28
3. 2 Desenvolvimento do modelo de hepatocarcinogênese <i>in vitro</i> e avaliação dos mecanismos da atividade quimiopreventiva do óleo de pequi	30
3. 2. 2 Modelo de hepatocarcinogênese <i>in vitro</i>	30
3. 2. 3 Determinação das concentrações de tratamento e exposição das células AML12 à aflatoxina B1 (AFB1) e ao óleo de pequi (OP).....	31
3. 2. 4 Análises da proliferação celular das subculturas expostas à AFB1 e AFB1+OP	34
3. 2. 4. 1 imunomarcagem para BrdU	34
4. 4 Análises estatística	43
4 Resultados.....	46
4. 1 Mecanismos da atividade quimiopreventiva do óleo de pequi na carcinogênese hepática <i>in vitro</i>	46
4. 1. 2 Efeito da AFB1 e do óleo de pequi na viabilidade celular de AML12.....	46
4. 1. 3 O óleo de pequi modula a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular das células AML12 expostas AFB1.....	47
4. 1. 6 O óleo de pequi inibi a geração de ROS intracelular e altera expressão de proteínas do sistema de defesa antioxidante de AML12 expostas à AFB1	51
4. 2 Avaliação do óleo de pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb) no estresse oxidativo e danos no DNA em linhagem de carcinoma hepatocelular humano - HepG2.....	53

4. 2. 1 O tratamento com óleo de pequi altera o conteúdo lipídico intracelular, mas não afeta a viabilidade celular na linhagem HepG2	54
4. 6. 2 Óleo de pequi inibe a geração de espécies reativas de oxigênios (ROS) intracelular na HepG2	55
4. 2. 4 O óleo de pequi reduz quebras na fita do DNA induzidas por peróxido de hidrogênio em células HepG2.....	56
5 Discussão	59
6 Conclusão	67
7 Referências	69

Lista de Figuras

Figura 1 – Fruto do pequi, Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb). Foto de José Antônio da Silva. Fonte: Revista de Biotecnologia ciência & Tecnologia.....	18
Figura 2 – Esquema de indução in vitro da carcinogênese.....	31
Figura 3 – Esquema dos ciclos de tratamentos da AML12 exposta à aflatoxina b1 (AFB1) e óleo de pequi (OP).....	33
Figura 4. Efeito na viabilidade celular de AML12 após exposição de 48 e 72 horas à AFB1 e OP+AFB1 após 48 horas (C) em diferentes concentrações.....	47
Figura 5 – Análise da capacidade proliferativa das células AML12 expostas à AFB1 (1µM) e combinação de AFB1 mais 5,62 µg/mL de óleo de pequi (OP+AFB1) por 40 ciclos (72 horas cada ciclo)	49
Figura 6 – Imunoblotting do efeito do óleo de pequi na expressão de pCdk2 e pHH3, proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular em células AML12 expostas à AFB1 (1µM)	50
Figura 7 – Efeito de AFB1 (1µM) e OP+AFB1 na morte celular de AML12.....	50
Figura 8 – Efeito na geração de ROS nas células AML12 tratadas com OP+AFB1 e AFB1.....	52
Figura 9 – Expressão de Catalase em células AML12 tratadas com AFB1 (1µM) e combinação de AFB1 mais 5,62 µg/mL de óleo de pequi (OP+AFB1)	53
Figura 10 – Efeito do óleo de pequi no crescimento celular da linhagem HepG2.....	55
Figura 11. Efeito protetor de OP na geração de ROS em células HepG2.....	56
Figura 12. Efeito do óleo de pequi na redução do dano ao DNA de células HepG2, induzidos por H ₂ O ₂	57

Lista de siglas

AFB1	Aflatoxina B1
AML12	<i>Alpha Mouse Liver 12</i>
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxiuridina
DCFDA	O 2',7' diacetato de diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
MTT	Tiazoyl Blue Tetrazolium Bromide
OP	Óleo de Pequi
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	Superóxido dismutase

Resumo

Palmeira SM. *Mecanismos da ação quimiopreventiva do óleo de pequi (Caryocar brasiliense Camb) na hepatocarcinogênese in vitro* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

O óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb) inibe o desenvolvimento da hepatocarcinogênese em camundongos, mas os mecanismos desse efeito ainda são desconhecidos. É importante entender como o óleo atua na quimioprevenção da carcinogênese, uma vez que este fruto, nativo do Brasil, possui uso promissor na prevenção do câncer hepático. Portanto, neste estudo buscamos identificar *in vitro* os mecanismos pelo qual o óleo de pequi inibe a hepatocarcinogênese. Para a avaliação dos possíveis mecanismos do óleo, foi estabelecido um modelo de carcinogênese hepática *in vitro*. A linhagem celular AML12 e o carcinógeno aflatoxina B1 (AFB1) foram utilizados no modelo. As células foram expostas à AFB1 (1µM), óleo de pequi (5,62 µg/mL) em combinação com AFB1 (OP+AFB1) e controle do veículo (DMSO 0,01%) por 40 ciclos, cada ciclo sendo 72h.). Subculturas das células tratadas com AFB1 e OP+AFB1 por 40 ciclos foram caracterizadas quanto ao ganho de fenótipo ou inibição de fenótipo maligno e foram avaliadas as seguintes alterações: alterações no crescimento pela quantificação do índice proliferativo pela imunomarcagem com BrdU e distribuição do ciclo celular por imunoblotting; alterações na morte celular foi avaliada pelo ensaio da apoptose com dupla marcação com os corantes anexina V e iodeto de propídio analisados em citometria de fluxo; e a avaliação do estresse oxidativo foi pela mensuração de espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizado o corante fluorescente DCFDA e a imunomarcagem por fluorescência de proteínas de defesa antioxidantes. Adicionalmente, avaliamos o efeito do óleo de pequi no estresse oxidativo e efeito antígeno-tóxico nas células HepG2 pela quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ensaio do cometa para determinar danos no DNA. Como resultados, encontramos que o óleo de pequi reduz a geração de ROS intracelular nas células AML12 expostas à AFB1. Possivelmente, o óleo atua nas defesas antioxidantes endógenas, responsáveis pela remoção de ROS. O óleo de pequi também diminuiu a geração de ROS e reduziu quebras nas fitas de DNA nas células HepG2 expostas ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂), reforçando seu efeito no controle de espécies reativas de oxigênio e indicando seu efeito antígeno-tóxico, pela inibição de danos oxidativos no DNA de células HepG2. Portanto, concluímos que o óleo de *C. brasiliense* age quimiopreventivamente na inibição do estresse oxidativo e na proteção do material genético contra danos oxidativos de hepatócitos pela redução de ROS e quebras nas fitas do DNA e potencialmente pode ser aplicado na prevenção do câncer hepático.

Descritores: *Caryocar brasiliense*; Antioxidante; Quimioprevenção; Carcinogêneses; Fígado; Aflatoxina B1.

Abstract

Palmeira SM. Mechanisms of the chemopreventive effect of pequi oil on *in vitro* hepatocarcinogenesis [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Pequi oil (*Caryocar brasiliense*, Camb) inhibits the development of hepatocarcinogenesis in mice, but the mechanisms of this effect are still unknown. It is important to understand how the oil acts in carcinogenesis chemoprevention, as this fruit, native to Brazil, has promising use in the prevention of liver cancer. Therefore, in this study, we sought to identify *in vitro* the mechanisms by which pequi oil inhibits hepatocarcinogenesis. To evaluate the possible oil mechanisms, an *in vitro* liver carcinogenesis model was established. The cell line AML12 and the carcinogen aflatoxin B1 (AFB1) were used in the model. Cells were exposed to AFB1 (1 μ M), pequi oil (5.62 μ g/mL) in combination with AFB1 (OP+AFB1) and vehicle control (0.01% DMSO) for 40 cycles, each cycle being 72h). Subcultures of cells treated with AFB1 and OP+AFB1 for 40 cycles were characterized according to the gain in phenotype or inhibition of the malignant phenotype and the following changes were evaluated: changes in growth by quantifying the proliferative index by immunostaining with BrdU and cell cycle distribution by immunoblotting; changes in cell death were evaluated by double-labeled apoptosis assay with annexin V and propidium iodide dyes analyzed by flow cytometry; and evaluation of oxidative stress was by measuring reactive oxygen species (ROS), the fluorescent dye DCFDA and immunostaining by fluorescence of antioxidant defense proteins were used. Furthermore, we evaluated the effect of pequi oil on oxidative stress and the antigenotoxic effect on HepG2 cells by quantification of reactive oxygen species (ROS) and a comet assay to determine DNA damage. As a result, we found that pequi oil reduces the generation of intracellular ROS in AML12 cells exposed to AFB1. It is possible that oil acts on endogenous antioxidant defenses that are responsible for the removal of ROS. Pequi oil also decreased ROS generation and reduced DNA strand breaks in HepG2 cells exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂), strengthening its effect on reactive oxygen species control and indicating its antigenotoxic effect by inhibiting oxidative damage to the DNA of HepG2 cells exposed to hydrogen peroxide. Therefore, we conclude that *C. brasiliense* oil acts chemopreventively in the inhibition of oxidative stress and in the protection of genetic material against oxidative damage from hepatocytes by reducing ROS and DNA strand breaks, and it can potentially be applied in the prevention of liver cancer.

Descriptors: *Caryocar Brasiliense*; Antioxidant; Chemoprevention; Carcinogenesis; Liver; Aflatoxin B1.

Introdução

1 Introdução

O pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb) é um fruto nativo do Cerrado brasileiro que possui uma polpa rica em lipídios, considerável teor de proteínas (Facioli e Gonçalves, 1998; Lima et al., 2007), alto teor de vitamina C (Almeida et al., 1998; Mariano-da-Silva et al. 2009) e compostos fenólicos (Roll et al., 2018). O óleo é utilizado na medicina popular para o tratamento de várias doenças (Almeida e Silva, 1994; Mariano-da-Silva et al., 2009), incluindo o câncer (Almeida, 2000). Há diversos ácidos graxos (Facioli e Gonçalves, 1998; Lima et al., 2007), vitamina E (Enes et al., 2011) e possui um conteúdo rico em carotenoides (Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004; Miranda-Vilela et al., 2011a, b). Estes compostos possuem propriedades antioxidantes e foram relacionadas aos efeitos biológicos encontrados em estudos realizados com o óleo de pequi (Rodriguez-Amaya, 1997; Lima e Mancini-Filho, 2005; Khoury et al., 2007; Miranda-Vilela et al., 2011b; Miranda-Vilela et al., 2011a; Colombo, 2014).

Em estudos anteriores, além do efeito antioxidante (Miranda-Vilela et al., 2011), foi observado efeito antimutagênico (Miranda-Vilela et al., 2009), atividade anti-inflamatória e controle de tumor (Miranda-Vilela et al., 2011a; 2014). Além disso, em um estudo prévio realizado por nós, o óleo da polpa de pequi também apresentou potente atividade na involução de lesões pré-neoplásicas no fígado de camundongos (Palmeira et al., 2015). Ele reduziu em até 51% o volume das lesões pré-neoplásicas e de adenomas e ainda a incidência de adenomas, no entanto, os mecanismos desse efeito quimiopreventivo não foram determinados. Portanto, é importante entender como o óleo atua na quimioprevenção da carcinogênese, uma vez que este fruto possui uso promissor na prevenção do câncer, uma grave enfermidade que acomete pessoas do mundo todo.



Figura 1 – Fruto do pequi, pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Foto de José Antônio da Silva. Fonte: Revista de Biotecnologia ciência & Tecnologia

O câncer está entre as principais causas de mortalidade no mundo, responsável por grandes perdas econômicas e humanas (Rather e Bhagat, 2018). Em 2020 foram aproximadamente 10 milhões de mortes, segundo estimativas do GLOBOCAN (Sung et al., 2021). Apesar das muitas pesquisas e dos avanços no tratamento do câncer, o número de novos casos é alto e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2020) a expectativa é que estes números continuem aumentando. Estima-se que serão aproximadamente 29 milhões de novos casos até 2040. O difícil tratamento associado aos altos custos motiva o interesse em estratégias de prevenção do câncer (Steward e Brown, 2013). O aumento na compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da carcinogênese e o sucesso na prevenção de alguns cânceres como os de mama, colo e próstata torna a quimioprevenção uma abordagem promissora de combate às neoplasias (Steward e Brown, 2013). Neste sentido, as plantas têm sido fonte de substância com grande potencial de uso na prevenção de diversos cânceres, assim como o pequi que se mostrou promissor na inibição da carcinogênese hepática.

O câncer hepático está entre as neoplasias de maior mortalidade no mundo. Em 2020 foi a terceira causa de morte mais comum por cânceres, com 830 mil mortes, segundo organização mundial de saúde (OMS) e estima-se que até 2025 mais de 1 milhão de pessoas em todo o mundo serão afetadas por tumor hepático (Llovet et al., 2021). O carcinoma hepatocelular (CHC) é o câncer hepático de maior frequência entre os tumores primários de fígado, seu prognóstico é ruim e as opções de tratamentos eficazes bem limitadas (Lee et al., 2022), sendo, portanto, uma neoplasia de difícil tratamento. Os fatores que levam ao seu desenvolvimento são múltiplos, sendo os principais relacionados à inflamação crônica (fibrose ou cirrose avançadas) induzida por infecção do vírus das hepatites (B e C) e consumo de álcool, esteatohepatite não-alcoólica, aflatoxina (Llovet et al. 2016). O desenvolvimento do CHC é um processo complexo e de múltiplas etapas (Nishida e Kudo, 2013; Ting et al., 2015), associado a alterações genéticas e epigenéticas (Lee et al., 2022) que estão envolvidas na ativação de certas vias oncogênicas e contribuem para ganho de função como aumento de proliferação celular, sobrevivência, evasão da resposta imune e invasividade, que desencadeia e perpetuando o processo carcinogênico (Ting et al., 2015; Llovet et al., 2021). Estas alterações no crescimento e sobrevivência celular são importantes alvos terapêuticos para o controle do câncer de fígado, portanto foram avaliadas neste estudo para entender o efeito do óleo de pequi nestes parâmetros.

Os estágios iniciais da hepatocarcinogênese são marcados por algumas alterações moleculares, entre elas, está a desregulação da resposta ao estresse oxidativo (Miyanishi et al., 2015; Takaki e Yamamoto, 2015; Llovet et al., 2016), que é caracterizado como sendo o resultado do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) e a capacidade antioxidante celular em manter esses em níveis não tóxicos no organismo (Sies, Berndt e Jones, 2017). Em condições fisiológicas

normais, as moléculas de ROS (principais são superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila) desempenham importantes funções na defesa do organismo e na sinalização celular (Takaki e Yamamoto, 2015). No entanto, em condição elevada, leva ao estresse oxidativo podendo comprometer a estrutura de macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA, levando ao dano oxidativo (Yang e Lee, 2015; Berra et al., 2013). Conseqüentemente, pode alterar algumas vias intracelulares, induzir expressão gênica, metabolismo celular, ciclo e morte celular (Zhou et al., 2016). Além disso, ROS pode estimular vias que regulam a sinalização da inflamação (Rafacho et al., 2014). Sabemos que, o carcinoma hepatocelular é o resultado da acumulação inflamatória crônica das células do fígado que evoluiu a cirrose (Ting et al., 2015) e que a inflamação pode contribuir para o desenvolvimento do câncer, mantendo um microambiente tumoral com moléculas bioativas que permite a sustentação da proliferação, sobrevivência, angiogênese, invasão, metástase do tumor (Hanahan e Weinberg, 2011) e do estresse oxidativo (Zhou et al., 2016). Uma vez que o estresse oxidativo, tem relação com a iniciação e progressão da carcinogênese hepática, nós avaliamos o efeito do óleo de pequi neste parâmetro. Mesmo porque o óleo de pequi é rico em substâncias carotenoides e possui atividade antioxidante e anti-inflamatória (Lima e Mancini-Filho, 2005; Miranda-Vilela et al., 2011, 2011a) e pode controlar o estresse oxidativo, contribuindo para diminuir o dano oxidativo no fígado.

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) celular pode ser o resultado de alterações da atividade de enzimas que integram o sistema de defesa antioxidante. Esse sistema enzimático antioxidante é composto por algumas enzimas como as superóxido dismutases (SOD) e as catalases. A superóxido dismutase, elimina superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) nas células. Nas células eucarióticas a SOD possui três formas, sendo a SOD1 a forma cobre-zinco dependente (CuZnSOD) a mais abundante e encontra-se, principalmente, no citosol

das células, onde está em altas concentrações (Aquilano et al., 2006). A superóxido dismutase dependente do manganês (MnSOD) ou SOD2, encontra-se na mitocôndria (Sheng et al., 2014), enquanto a SOD3 ou EC-SOD, também cobre-zinco dependente, encontra-se no meio extracelular (Zelko et al., 2002). A SOD é umas das enzimas mais relevantes, especificamente a SOD1 (Singh et al. 2015), pois é a primeira defesa na via do estresse oxidativo (Fridovich, 1997; Montllor-Albalate et al., 2022) e sua ausência ou baixos níveis têm sido relacionado com crescimento tumoral. Em camundongos com ausência de SOD1 houve aumento na incidência de hepatocarcinogênese relacionada ao estresse oxidativo (Elchuri et al., 2005). Já a catalase, é a principal enzima responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), também produzido pela ação da SOD, reduzindo-o em O_2 e água, inibindo a formação do radical hidroxila (Sepasi Tehrani e Moosavi-Movahedi, 2018). O radical hidroxila (HO^*), apesar de possuir meia vida muito curta, é o mais reativo e danoso às macromoléculas (Halliwell et al., 2021). Já o peróxido de hidrogênio, apesar de não possuir eletros desemparelhados (é um não-radical), é um intermediária na reação que produz o radical hidroxila. O H_2O_2 possui meia-vida longa, comparado aos demais ROS e é capaz de atravessar membranas intracelulares, podendo alcançar o núcleo onde pode reagir com íons de metais gerando o radical hidroxila, que é capaz de danificar o DNA, ocorrendo também com outras macromoléculas (Halliwell et al., 2021). Em altas concentrações, o peróxido de hidrogênio é preferencialmente eliminado pela enzima catalase, que é altamente eficiente nesta remoção (Sepasi Tehrani e Moosavi-Movahedi, 2018). Portanto, SOD1 e catalase junto com as demais enzimas, evitam danos oxidativos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e mantêm o status antioxidante da célula. Alterações nas defesas antioxidantes se relacionam com diferentes patologias, inclusive com neoplasias. Por exemplo, baixos níveis de SOD1 e catalase

estão relacionados a cânceres. Também foi encontrado baixos níveis destas enzimas em hepatócitos tratados com carcinógenos como dietilnitrosamina (Nuno et al., 2014), ácido tricloroacético (Mokhamer et al., 2022) e aflatoxina B1 (Eraslan et al., 2017).

Como já mencionado anteriormente, o dano oxidativo no DNA pode iniciar o processo carcinogênico induzido por ROS, o quais participam de mecanismo como sinalização celular, proliferação, invasividade, angiogênese e metástase tumoral (Yang e Lee, 2015). No fígado, níveis elevados de geração de ROS e o dano oxidativo no DNA foram associados à hepatocarcinogênese (Chuma et al., 2008). Aqui, nós avaliamos o efeito antigenotóxico do óleo de pequi em hepatócitos de carcinoma hepatocelular, uma vez que, foi observado em estudo anterior que o óleo reduz danos oxidativos (Miranda et. Al., 2011).

Modelos *in vitro* são importantes ferramentas para o estudo de mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer. Apesar de suas limitações, possuem papel fundamental na descoberta de vias celulares importantes e genes cruciais envolvidos no processo neoplásico (Kaemmerer et al., 2016). Apesar de existirem diversos modelos de hepatocarcinogênese disponíveis em animais de laboratório, não há nenhum modelo *in vitro* bem estabelecido que possa ser utilizado em estudos de quimioprevenção. Considerando esta necessidade e atendendo a atual tendência mundial que busca a redução do uso de animais sempre que possível, neste estudo estabelecemos um modelo que foi utilizado para as avaliações dos mecanismos de ação do óleo de pequi nas fases iniciais da carcinogênese hepática. Nos baseamos em um modelo de carcinogênese pulmonar estabelecido por Mennecier et al. (2014) no laboratório de oncologia experimental e comparada - LOEC da FMVZ-USP. Eles utilizaram células epiteliais E9 de camundongos e o carcinógeno NNK e após 20 ciclos sucessivos de exposição a este carcinógeno obtiveram células neoplásicas. Quando inoculadas em

camundongos, estas células revelaram-se tumorigênicas, demonstrando a eficácia do modelo. Para nosso estudo, utilizamos as células AML12 (ATCC), hepatócitos murinos imortalizados e o carcinógeno aflatoxina B1 (AFB1).

A AFB1 é um produto do metabolismo secundário de fungos da espécie *Aspergillus flavus*. Ela é encontrada como contaminante em diversos alimentos e sua ingestão está associada com o carcinoma hepatocelular (CHC) (IARC, 2002; Haila Abassi et al. 2016; Yaqi Dai et al. 2017). Sua bioativação ocorre no fígado (principal sítio de seu metabolismo) mediado pelo citocromo p450 (CYP450), resultando em intermediários reativos que se ligam a macromoléculas como DNA (formando adutos) e RNA, e organelas celulares. Além disso, AFB1 promove aumento da produção de ROS, danos oxidativos e oxidação lipídica, que em último caso pode levar a dano ou morte celular (Ribeiro, 2005; Rieswijk et al. 2016; Wang et al. 2016; Yaqi Dai et al. 2017). Esta aflatoxina é um potente hepatocarcinógeno genotóxico, que pode também causar tumores em outros órgãos (Vinken et al. 2008; Singh et al. 2015; Ferreira et al. 2019). Esse carcinógeno pode induzir carcinogênese tanto em modelos *in vivo* como em modelos *in vitro* (Wang et al. 2017; Shing et al. 2015; Pang et al. 2008).

Considerando a gravidade do câncer hepático e a importância de buscar novas abordagens preventivas e terapias alternativas para combater a doença ou aumentar a eficácia de drogas anticâncer, diminuindo a toxicidade destas e assim melhorando a qualidade e sobrevida do paciente com CHC, nós avaliamos alguns mecanismos do óleo de pequi envolvidos na inibição da carcinogênese hepática, visto que ele se mostrou promissor como quimiopreventivo do câncer hepático em estudo anterior. Também é importante ressaltar que, a quimioprevenção a partir de agentes naturais é uma estratégia promissora pois compostos bioativos presentes em fontes dietéticas podem atuar em diferentes fases do desenvolvimento neoplásico como agentes bloqueadores ou

supressores, podendo regular eventos celulares e moleculares envolvidos na carcinogênese (Steward e Brown, 2013; Ting et al., 2015). Eles podem ser incorporados ao organismo através da alimentação (Cerqueira et al., 2007), portanto, podem ser utilizados como estratégia quimiopreventiva de baixo custo, acessível e de fácil aplicabilidade no controle do câncer hepático, como o pequi, que inibe estresse oxidativo e protege o material genético contra danos oxidativos de hepatócitos.

Objetivos

2 Objetivos

Avaliar possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos no efeito quimiopreventivo do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) na hepatocarcinogênese. Para isso, estabelecer um modelo *in vitro* de carcinogênese hepática pela exposição de hepatócitos à aflatoxina B1 para testar o efeito do óleo na proliferação, apoptose e estresse oxidativo, como possíveis mecanismos de ação; também avaliar o efeito do óleo no estresse oxidativo e danos no DNA de hepatócitos humanos, da linhagem HepG2.

Métodos

3 Métodos

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP (números de registro 2211061115 e 2309170817) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina – FM/USP com registro 026/16.

O estudo está dividido em duas partes, sendo a primeira a avaliação dos mecanismos do óleo de pequi na linhagem AML12 expostas à aflatoxina B1 e segunda parte refere-se à avaliação do efeito do óleo em linhagem de hepatócitos humanos, HepG2.

3.1 Preparo e análise química do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb)

O óleo de *Caryocar brasiliense* foi cedido pelo professor Dr. César K. Grisolia da Universidade de Brasília – UnB. Após ser extraído a frio através de prensa mecânica da polpa do pequi fresco, o óleo foi filtrado a vácuo e acondicionado em frasco âmbar. Para o preparo das soluções de tratamentos, o óleo de pequi (OP) foi dissolvido em etanol. Porém, para que a concentração final de etanol não ultrapassasse 0,2% foi preparada uma solução concentrada de OP (50 mg/mL) para ser diluída em PBS 1x ou em meio de cultivo, obtendo uma solução intermediária de 2160 µg/mL que na sequência foi diluída para a concentração final (5,62 µg/mL).

Para a verificação qualitativa dos ácidos graxos saturados e insaturados, tabela 1 (Miranda-Vilela et al., 2011), foi realizada a análise química do óleo de Pequi na Central Analítica no Instituto de Química – USP, por método de Cromatografia Gasosa, em

coluna BPX5 5% fenil polisilfenileno. Os carotenoides totais foram determinados de acordo com a descrição de Fidrianny et al. (2013). O óleo foi diluído em n-hexano a 10 mg/mL. Então, 1 mL do extrato diluído teve a absorbância mensurada a 470 nm em uma cubeta de 10 mm de caminho óptico. O beta caroteno nas concentrações de 0,25 a 10 µg/mL foi utilizado como padrão. O teor de carotenoides totais foi expresso como miligramas equivalentes de beta caroteno por grama de óleo (mg BC/g). Este ensaio foi realizado em triplicata no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Federal de Tocantins/UFT - Palmas.

Tabela 1 – Composição relativa do óleo da polpa de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Adaptada de Miranda-Vilela et al. (2011).

Ácidos graxos ¹		Vitaminas ²	Carotenóides ³
Saturados (%)	Insaturados (%)		Tipos (mg/100g)
Palmítico (41,78)	Oleico (54,28)	Vitamina C (78,3)	Pró-vitamina A (6,26 – 11,5)
Esteárico (1,28)	Palmitoleico (0,67)	Vitamina E (0,607)	Licopeno (1,12 – 2,08)
Araquídico (0,12)	Linoleico (1,36)		
	Linolênico (0,51)		
Total (43,18)	Total (56,88)	Total (78,9)	Total (6,75 – 28,66)

³ Ramos et al., 2001; ³ Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004; ³ Oliveira et al., 2006; ³ Lima et al., 2007; ¹ Miranda-Vilela et al., 2009; ² Almeida et al., 1988; ² Enes et al., 2011.

3. 2 Desenvolvimento do modelo de hepatocarcinogênese *in vitro* e avaliação dos mecanismos da atividade quimiopreventiva do óleo de pequi

Para o desenvolvimento do modelo de carcinogênese hepática *in vitro* foi utilizada a linhagem comercial AML12.

3. 2. 1 Cultivo celular da linhagem AML12

A linhagem celular AML12 (hepatócitos normais de camundongo transgênico para TGF α humano) (ATCC CRL-2254) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ 0354). Ela foi mantida em meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% da mistura de penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL), 1% Insulin-Transferrin-Selenium - ITS-G 11 (Gibco®) (0.005 mg/ml insulina, 0.005 mg/ml transferrina, 5 ng/ml selênio) e mais 40ng/ml de dexametasona. As culturas foram semeadas em garrafas de 25 ml contendo meio suplementado (descrito acima) trocado a cada 48h e a incubação feita em estufa umidificada (95% de ar e 5% de CO₂) a 37 °C. Para o ensaio de indução de fenótipo transformado, as células foram tratadas com aflatoxina B1 (AFB1 – *Aspergillus flavus*, cód. A6636-1MG, Sigma-Aldrich).

3. 2. 2 Modelo de hepatocarcinogênese *in vitro*

Para a realização do modelo de carcinogênese hepática foi utilizado o esquema abaixo (Fig. 2), conforme proposição de Siriwardhana et al., (2008). Apesar de ter sido

padronizado para células epiteliais mamárias, o mesmo modelo foi utilizado para células epiteliais pulmonares (Mennecier et al., 2014) com sucesso e nós o reproduzimos utilizando hepatócitos.

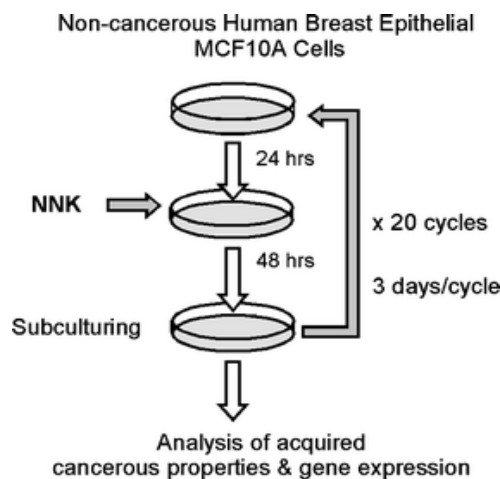


Figura 2 – Esquema de indução in vitro da carcinogênese (Siriwardhana et al., 2008).

3. 2. 3 Determinação das concentrações de tratamento e exposição das células AML12 à aflatoxina B1 (AFB1) e ao óleo de pequi (OP)

Ensaio de citotoxicidade – MTT.

As células AML12 foram semeadas em placa de 96 poços na densidade de $0,5 \times 10^3$ por poço. Passadas 24h foram tratadas com 0.001, 0.01, 0.1, 1 e 10 μM de AFB1 por 48 e 72h. A viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio colorimétrico do Tiazoyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT). Três (3) horas antes do término dos tempos de tratamento 48 e 72 horas, adicionamos ao meio a solução de MTT (Amresco, Inc., EUA) a 0,5mg/mL (10 μL de MTT a cada 100 μL de meio de cultivo) e incubada sob proteção da luz em estufa de CO₂, a 37 °C. Após esse período, as placas foram centrifugadas, o

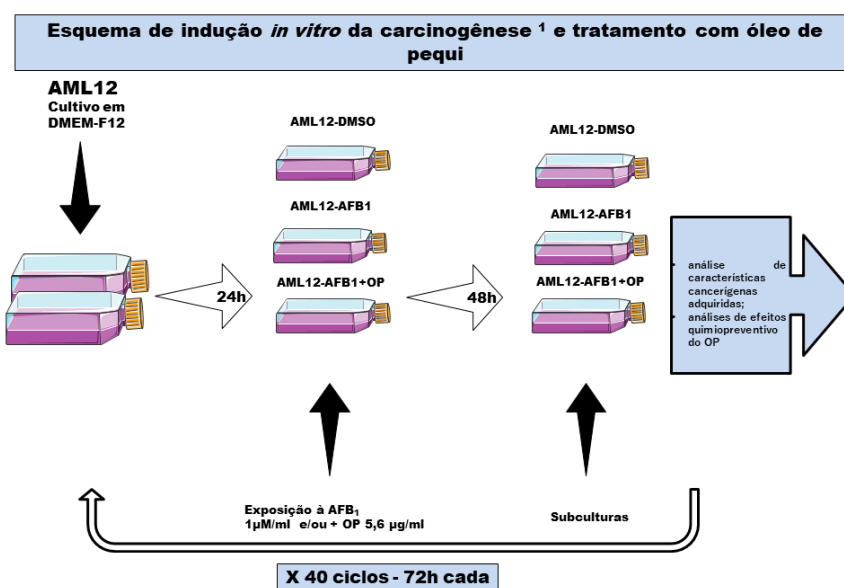
sobrenadante descartado e adicionado 100 μ L de DMSO/poço para dissolver os cristais de formazan. A leitura foi em espectrofotômetro a 570 nm. A viabilidade celular foi calculada como porcentagem do controle negativo (DMSO). Foi escolhida a concentração com baixa citotoxicidade levando em consideração o protocolo adotado com ciclo de exposição de 48 horas.

Para determinação da concentração de tratamento com óleo de pequi (OP), foi realizado um novo ensaio de citotoxicidade utilizando o MTT. As células AML12 foram semeadas em placa de 96 poços na densidade de 3×10^4 por poço. Passadas 24h, foram expostas a 1μ M de AFB₁ (concentração definida anteriormente) e a diferentes concentrações do óleo de pequi (380 - 180 - 90 - 45 - 22,5 - 11,25 e 5,625 μ g/mL) por 48hs. A viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio colorimétrico do Tiazoyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) e seguiu o mesmo protocolo anterior. A leitura foi em espectrofotômetro a 570 nm e a viabilidade celular foi calculada como porcentagem do controle negativo (DMSO = 100%). Foi escolhida a concentração com baixa citotoxicidade levando em consideração o protocolo adotado com ciclo de exposição de 48 horas.

Exposição

Após determinação das concentrações não citotóxicas de AFB₁ e OP as células AML12 foram tratadas por 40 ciclos consecutivos, com duração de 72 horas cada ciclo. Este procedimento sucedeu-se detalhadamente da seguinte forma: as células AML12 foram semeadas na densidade de 5×10^5 em garrafas de 25 cm^3 em meio DMEM-F12, com suplementação, já descrita anteriormente, e após 24 horas (período de adesão celular) foram expostas aos tratamentos (AFB₁ e AFB₁+OP) nas concentrações de 1μ M/mL e 5,62 μ g/mL, respectivamente por 48h, totalizando 72 horas correspondendo a um ciclo.

Passado esse período de exposição aos tratamentos, as células foram tripsinizadas (tripsina 0,25%), centrifugadas, o sobrenadante descartado, as células ressuspendidas em meio de cultivo novo e novamente semeadas, iniciando um novo ciclo. Este procedimento sucedeu-se por 40 ciclos consecutivos (Fig. 3). Para validação dos resultados foram preparados controles, onde as células passaram também por 40 ciclos, porém foram expostas apenas ao solvente veículo, dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Subculturas das células tratadas por 40 ciclos com AFB1 foram caracterizadas quanto às alterações no crescimento, morte celular e aumento no estresse oxidativo e se o tratamento com OP+AFB1 inibiu estes eventos. Estas análises estão descritas nos itens que se seguem.



1 Siriwardhana et al., (2008)

Figura 3 – Esquema dos ciclos de tratamentos da AML12 exposta à aflatoxina b1 (AFB1) e óleo de pequi (OP).

3. 2. 4 Análises da proliferação celular das subculturas expostas à AFB1 e AFB1+OP

3. 2. 4. 1 imunomarcção para BrdU

As células foram semeadas em placa de 96 poços na densidade de 1×10^4 por poço e incubadas em estufa umidificada (95% de ar e 5% de CO₂) a 37 ° C. Após 24 horas para adesão celular, as células foram incubadas por 3h com uma solução a 10 μM de BrdU em estufa umidificada. Após o término da incorporação do BrdU, as células foram lavadas com PBS por 5 vezes e em seguida fixadas com etanol 70% por 20 minutos em temperatura ambiente. Seguiu-se com a hidrólise do DNA, o qual foi desnaturado com HCL 2M por 20 minutos a 37 ° C e em sequência neutralizado com tampão borato. Após a bloqueio das peroxidases por 30 minutos foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos (1% de BSA + 1% Triton 0,1% + soro de cabra 2% em PBS pH 7,4). Na sequência foi realizado o protocolo para imunocitoquímica padrão. O anticorpo primário utilizado foi o anti-BrdU clone BU 33 (sigma-Aldrich, n° cat. B8434) incubado *overnight* na diluição 1:500. Após 18h de incubação do anti-BrdU foi utilizado o polímero SuperPicture (Invitrogen, n° cat 87-8963) como sistema de amplificação e detecção, incubado por 20 minutos em temperatura ambiente, seguido de lavagem e revelação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB, Dako). As imagens foram capturadas pelo sistema de análise de imagens Zen Blue (Zeiss) e a contagem automática das células positivas foram realizadas com auxílio do programa open source QuPath, disponível em <https://qupath.readthedocs.io/en/stable/#>.

3. 2. 5 Análise da distribuição do ciclo celular por *Western blotting* e morte celular pelo ensaio de apoptose (Anexina V) por citometria de fluxo

3. 2. 5 a) Ensaio de apoptose (anexina V) por citometria de fluxo

Para análises de apoptose, após término dos ciclos de tratamentos, as subculturas foram cultivadas em garrafas de 25 cm² (triplicatas), até atingirem densidade de 10⁶ células. Antes de serem colhidas, as células foram expostas por 30 minutos ao peróxido de hidrogênio (0,2 mM) à 37 °C para indução de morte. Em sequência, o meio de cultura foi removido, as células foram tripsinizadas, recolhidas em tubo para citometria e coradas com o kit *Alexa® Fluor 488 annexin V* (cód. V13245; Molecular Probes, EUA) e Iodeto de Propídio (PI) de acordo com o protocolo do fabricante. A análise do índice de apoptose foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur com sistema de atualização multicolorida Cytex DxP (BD-Cytec, EUA) usando FlowJo-CE 7,5v (Cytex, EUA) e análise dos dados no Software FlowJo 10.7v (BD, EUA).

3. 2. 5 b) Extração de proteínas e análise de *western blotting*

Para análise molecular do ciclo e morte celular, foram extraídas proteínas totais das células tratadas. A extração foi realizada com RIPA lysis and extraction buffer (cat. n° 89900; Thermo Fisher Scientific) suplementado com inibidor de protease. As concentrações das proteínas foram determinadas pelo método Bradford. Quantidades iguais (50 µg) de proteínas totais das amostras dos diferentes tratamentos foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) 4-12% e transferidas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), que na sequência

foram bloqueadas por 60 minutos em leite desnatado 5% em temperatura ambiente. Ao término do bloqueio, a membrana foi incubada com o coquetel de anticorpos primários (pCdk/pHH3/Actin/PARP - Cell Cycle and Apoptosis WB Cocktail; cat n°. ab139417; Abcam) na concentração 1:250, *overnight* a 4 °C. No próximo dia, a membrana foi incubada com secundário conjugado com HRP (1:250), fornecido no mesmo kit que o primário, por 60 minutos em temperatura ambiente. Para a visualização das bandas foi utilizado o kit ECL-HRP (cat n°. RPN2132; GE Healthcare).

3. 2. 6 Avaliação do estresse oxidativo pela mensuração de ROS intracelular, imunofluorescência (enzima SOD1 e catalase) e *western blotting* para enzima SOD1

3. 2. 6. a) Geração de ROS intracelular

A aflatoxina está relacionada ao aumento da produção de espécies reativas e danos oxidativos (Ribeiro, 2005; Rieswijk et al. 2016; Yaqi Dai et al. 2017). Para caracterização das células expostas à AFB1 quanto ao metabolismo oxidativo e avaliação do efeito de OP sobre as células expostas a este carcinógeno, foi realizado o ensaio de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular. Para a realização deste ensaio, foi utilizado um kit para detecção de ROS DCFDA (n° cat. ab113851, Abcam). O 2',7' diacetato de diclorofluoresceína é um corante fluorogênico permeante que mede a atividade de peróxil, hidroxil, entre outras espécies reativas de oxigênio na célula. Após sua difusão na célula, o DCFDA é desacetilado por esterases celulares a um composto não fluorescente, sendo depois oxidado por ROS em 2' 7' diclorofluoresceína (DCF) um composto altamente fluorescente e que pode ser detectado por espectroscopia de fluorescência. As células foram plaqueadas em placa de 96 poços de fundo claro e laterais

pretas na densidade de $1,25 \times 10^4$ células por poço. Após 24 horas de incubação as células foram lavadas e 100 μ l de solução de DCFDA (20 μ M) foram adicionados às células e incubado por 45 minutos, ao abrigo da luz, a 37 °C. O DCFDA foi removido e as células lavadas com PBS uma vez, seguida pela exposição das células a 0,2 mM de H₂O₂ por 30 minutos para simular uma condição pró-oxidante e a geração de ROS. A fluorescência foi mensurada em leitor de microplacas Hidex (modelo 425-301, Filândia) com excitação e emissão 485 nm/535 nm comprimento de onda, respectivamente. A mensuração de ROS foi expressa como aumento da intensidade de fluorescência em comparação ao controle (células expostas apenas ao solvente DMSO).

3. 2. 6. b) Ensaio de imunofluorescência para SOD1 e catalase

As subculturas das células tratadas por 40 ciclos com os diferentes tratamentos foram cultivadas sob lamínulas em placas de 6 poços. Após atingirem confluência necessária e antes da fixação, as células foram expostas ao H₂O₂ (0,2 mM) por 30 minutos a 37 °C. Ao término dos 30 minutos, as células foram lavadas com PBS contendo 0,05% tween e na sequência fixadas em formaldeído 4% (formaldeído 40% diluído em PBS pH 7,3) ou metanol (10 a 20 minutos à -20 °C) de acordo com o protocolo de imunomarcção de interesse. Para a imunomarcção de anti-SOD1 Rabbit policlonal (cod. ab13498, Abcam) inicialmente as células passaram por bloqueio das peroxidases endógenas (H₂O₂ + 10% de H₂O₂) por 20 minutos e bloqueio das proteínas inespecíficas (PBS+BSA 5% + triton 0,03%) por 60 minutos, ambos em temperatura ambiente. Na sequência as células foram incubadas com anticorpo primário (1:300 diluído em solução de PBS+ 1% de BSA + 0,03% de Triton X-100) *overnight* a 4 °C. Para a marcação com anti-Catalase (cód.

ab16731, Abcam) as células foram lavadas com PBS, seguido de permeabilização e bloqueio das proteínas inespecíficas com 0,1% de Triton X-100 e BSA 5% em PBS por 25 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo primário (1:200) diluído em TNB foi incubado *overnight* a 4 °C. No segundo dia, o protocolo foi igual para ambas as marcações (SOD1 e Catalase). Após lavagem com PBS (acrescido de tween 0,05% para SOD1) por três vezes, as células foram incubadas com o secundário biotilado anti-coelho (1:200; cód. ab97049, Abcam) por 60 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com 80 µL/lamínula de Estreptavidina-HRP (cód. Ab64269, Abcam) por 30 minutos em câmara escura. Após lavagem (três vezes de 5 minutos), para amplificar o sinal da fluorescência, as células foram incubadas com Tiramida-Fluoresceína (1:200; TSA™ - Fluorescein System; cód. NEL701A001KT, Perkin Elmer, EUA) por 10 minutos em câmara úmida. Para finalizar, após lavagem, as células foram incubadas em Iodeto de Propídio (1:100) por 10 minutos, seguido de montagem das lâminas, vedadas com Prolong Antifade®. As imagens foram capturadas em microscópio Olympus BX60F5 (Olympus Optical Co., Ltd., Japão).

3. 2. 6. c) Ensaio de *western blotting*

O anticorpo primário utilizado foi anti-SOD1 Rabbit policlonal (cod. ab13498, Abcam). O protocolo adotado foi o mesmo descrito anteriormente (item **3. 2. 5 b**). Resumidamente 50 µg de proteínas totais das amostras foram separadas por SDS-PAGE 4-12% e transferidas em membrana PVDF, bloqueadas por 60 minutos em leite desnatado 5% em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários na concentração 1:1000, *overnight* a 4 °C. Após incubação das membranas com

secundário conjugado com HRP por 60 minutos em temperatura ambiente, as bandas foram visualizadas utilizando o kit ECL-HRP (cat n°. RPN2132; GE Healthcare).

3. 3 Avaliação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) no estresse oxidativo e danos no DNA em linhagem de carcinoma hepatocelular humano - HepG2

3. 3. 1 Cultivo celular e tratamento

As células HepG2, cedidas pela prof^a Maria Z. Dagli, foram mantidas em meio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's médium – DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% da mistura de penicilina (100 IU/mL), estreptomicina (100µg/mL), incubadas em estufa umidificada (95% de ar e 5% de CO₂) a 37 ° C. O óleo de pequi, doado pelo professor Dr. Cesar K. Grisolia (Universidade de Brasília – UnB) foi dissolvido em etanol. Para que a concentração final de etanol não ultrapassasse 0,2% foi preparada uma solução mais concentrada do óleo de pequi para ser diluída em PBS 1x ou em meio de cultivo. Para a realização dos ensaios de MTT, mensuração da produção de ROS intracelular, ensaio do cometa e concentração de lipídios intracelular, foram testadas as concentrações de 90 e 180 µg/mL do óleo de pequi. Para cada ensaio foi preparado os respectivos controles.

3. 3. 2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi definida pelo método colorimétrico descrito por Carmichael et al. (1987). As células foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 10⁴ células/poço em um volume final de 200 µl e tratadas nas concentrações (90 e 180

$\mu\text{g/mL}$) do óleo de pequi a 37°C . Quatro horas antes do término dos tempos de tratamento 24 e 48 horas foi adicionado ao meio a solução de MTT (Tiazoyl Blue Tetrazolium Bromide – Amresco, Inc., EUA) a $0,5\text{mg/mL}$ ($10\mu\text{L}$ de MTT a cada $100\mu\text{L}$ de meio de cultivo) e incubadas sob proteção da luz em estufa de CO_2 , a 37°C . Após esse período, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e adicionado $100\mu\text{L}$ de DMSO/poço para dissolver os cristais de formazan. A leitura foi feita em leitor Elisa (570 nm). A viabilidade celular foi calculada como porcentagem do controle veículo (Etanol). Este ensaio foi realizado em sextuplicatas.

3. 3. 3 Quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular

Para a realização deste ensaio foi utilizado um kit para detecção de ROS DCFDA (DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit, Abcam). O 2',7' diacetato de diclorofluoresceína é um corante fluorogênico permeante que mede a atividade de peróxil, hidroxil, entre outras espécies reativas de oxigênio na célula. Após sua difusão, o DCFDA é desacetilado por esterases celulares a um composto não fluorescente, sendo depois oxidado por ROS em 2' 7' diclorofluoresceína (DCF) um composto altamente fluorescente e que pode ser detectado por espectroscopia de fluorescência. As células HepG2 foram plaqueadas em placa de 96 poços, fundo claro e laterais pretas na densidade de $2,5 \times 10^4$ células por poço. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com o óleo de pequi nas diferentes concentrações (90 e $180\mu\text{g/mL}$) e incubadas por mais 24 horas. Ao término deste período, as células foram lavadas com tampão (kit) e $100\mu\text{l}$ de solução de DCFDA ($25\mu\text{M}$) foram adicionados às células que foram incubadas por 45 minutos, ao abrigo da luz, a 37°C em estufa umidificada. Ao término da incubação, o

DCFDA foi removido e as células foram tratadas com uma solução (100 µl) de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,2 mM por 10 minutos para indução de estresse oxidativo. A fluorescência foi mensurada em leitor de microplacas Hidex (modelo 425-301, Filândia) com excitação e emissão 485 nm/535 nm comprimento de onda, respectivamente. A mensuração de ROS foi expressa como aumento da intensidade de fluorescência em comparação aos controles (células não tratadas com o óleo de pequi).

3. 3. 4 Ensaio do cometa (eletroforese em gel de célula única)

O dano no DNA é um marcador de estresse oxidativo e pode ser mensurado pelo ensaio do cometa. Por este ensaio, o estresse oxidativo pode ser medido indiretamente ao invés de medir diretamente espécies reativas de oxigênio. Nós optamos por realizar este ensaio uma vez que este é um marcador de estresse oxidativo mais duradouro e por fornecer informações sobre efeitos antigenotóxico e capacidade de reparo celular dos compostos.

3. 3. 4. 1 Tratamento das células

Este ensaio foi realizado seguindo o protocolo de Angeli et al., (2009) com modificações. Em placa de 24 poços, 2×10^5 de células foram adicionadas por poço e incubadas por 24 horas. As células foram tratadas de acordo com os seguintes protocolos:

Pré-tratamento – após as 24 horas de adesão, o meio foi removido e as células foram tratadas com óleo de pequi em duas concentrações (90 µg e 180 µg) por 1h. Em sequência foram lavadas com PBS 1x e as células tratadas com peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) a 0,2 mM por 10 minutos. As células foram novamente lavadas com PBS e em seguida tripsinizadas.

Pós-tratamento – após 24 horas de adesão, as células foram lavadas com PBS 1x e tratadas com H₂O₂ a 0,2 mM por 10 minutos. Na sequência foram lavadas e seguido do tratamento com o óleo de pequi nas duas concentrações (90 µg e 180 µg) por 1 hora. Ao término do tempo foram lavadas e tripsinizadas.

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com as recomendações no protocolo do fabricante do kit (ab238544 Comet Assay Kit, Abcam). Após os tratamentos, descritos acima, as células foram ressuspensas na densidade de 1×10^5 células por ml em PBS 1x gelado sem Mg²⁺ e Ca²⁺. A suspensão celular foi misturada à agarose numa proporção de 1:10 (v/v) e então 75 µl desta mistura (agarose + suspensão celular) foram pipetados em cada poço da lâmina (fornecida pelo kit). Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão gelado de lise, solução alcalina e na sequência foram submetidas à eletroforese em câmara horizontal de eletroforese em gel. Para a solução de corrida foi utilizado o tampão de eletroforese alcalino (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13). Para a eletroforese foi aplicado 1V/cm por 30 minutos e corrente de 300 mA. Após a eletroforese as lâminas foram coradas com o corante de DNA Vista Green (fornecido no kit) e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram fotografadas utilizando um microscópio de luz com fluorescência (Nikon, modelo Eclipse 80i). Para quantificação, um mínimo de 50 células por tratamento, foram selecionadas de forma aleatória e analisadas utilizando o software CASP (versão CASP_1.2.3b1). O parâmetro utilizado como índice de dano induzido no DNA foi o momento da cauda, já que considera ambos, tanto a migração do material genético quanto a quantidade relativa de DNA na cauda (momento da cauda = comprimento da cauda multiplicado pela porcentagem de DNA na cauda).

3. 4 Mensuração de lipídios intracelular pelo corante *Nile Red* em células HepG2 tratadas com óleo de pequi

O vermelho de Nilo é um corante fluorescente hidrofílico ideal para marcação de lipídios. A característica do seu sinal fluorescente depende da hidrofobicidade do lipídio que resulta em uma mudança de emissão de vermelho para amarelo dependendo da polaridade do lipídio (Diaz et al., 2008). Este ensaio foi realizado para avaliar se o óleo de pequi nas diferentes concentrações testadas nos experimentos anteriores leva a um aumento na acumulação de gordura nas células HepG2. As células foram plaqueadas em placas com laterais escuras e fundo claro, de 96 poços com $2,5 \times 10^5$ células por poço. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de óleo de pequi e incubadas por mais 24 horas em estufa umidificada, a 37 °C. Ao término do período de 24 horas, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e em seguida foi adicionado 100 µl em cada poço de solução com vermelho do Nilo (0,25mg/mL) e incubadas por 15 minutos em estufa umidificada a 37 °C. Após a incubação, o corante foi removido e a placa lavada com PBS por duas vezes. A fluorescência foi mensurada em leitor de microplacas Hidex (modelo 425-301, Filândia) com excitação e emissão 488 nm/544 nm de comprimento de onda, respectivamente. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional ao conteúdo intracelular de lipídios neutros. O acúmulo de gordura foi expresso como aumento da intensidade de fluorescência em comparação ao controle (células HepG2 não expostas às concentrações do óleo).

4. 4 Análises estatística

Todas as análises foram com o auxílio do software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software version 9.3.1. 471, Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram analisados pelo teste de múltiplas comparações kruskal-wallis, seguido de pós teste de Dunn quando os resultados foram significantes. Diferenças entre grupos foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

Resultados

4 Resultados

A análise química qualitativa do óleo de pequi realizada na Central Analítica no Instituto de Química – USP identificou a presença das substâncias analisadas: ácidos graxos saturados, insaturados e carotenoides. Na determinação dos carotenoides totais a concentração no óleo de pequi foi de $16,850 \pm 0,064$ mg BC/g.

4. 1 Mecanismos da atividade quimiopreventiva do óleo de pequi na carcinogênese hepática *in vitro*

Os clones de AML12 tratados por 40 ciclos com AFB1 (1 μ M) foram caracterizados quanto às alterações no controle do crescimento celular, morte celular, aumento no estresse oxidativo e se estes distúrbios foram amenizados no tratamento com o óleo de pequi (OP) na concentração de 5,62 μ g/ml.

4. 1. 2 Efeito da AFB1 e do óleo de pequi na viabilidade celular de AML12

O teste do MTT foi utilizado para avaliar a concentração da aflatoxina B1 (AFB1) e aflatoxina B1 mais óleo de pequi (OP+AFB1) capaz de afetar a viabilidade celular da AML12. Após os tempos de tratamento (48 e 72 horas) com o carcinógeno em concentrações crescentes, a AFB1 reduziu a viabilidade celular tempo e concentração-dependente comparado ao controle (Fig. 4 A-B). Quando avaliado o tratamento com OP em suas diferentes concentrações (180, 90, 45 e 5,62 μ g/mL) mais AFB1 (1 μ M) não foi observado diminuição significativa no crescimento celular de AML12 (fig. 4-C). A partir

destes resultados a concentração de 1 μ M de AFB1 e de 5,62 μ g/mL de OP foram adotadas como concentrações para uso neste estudo.

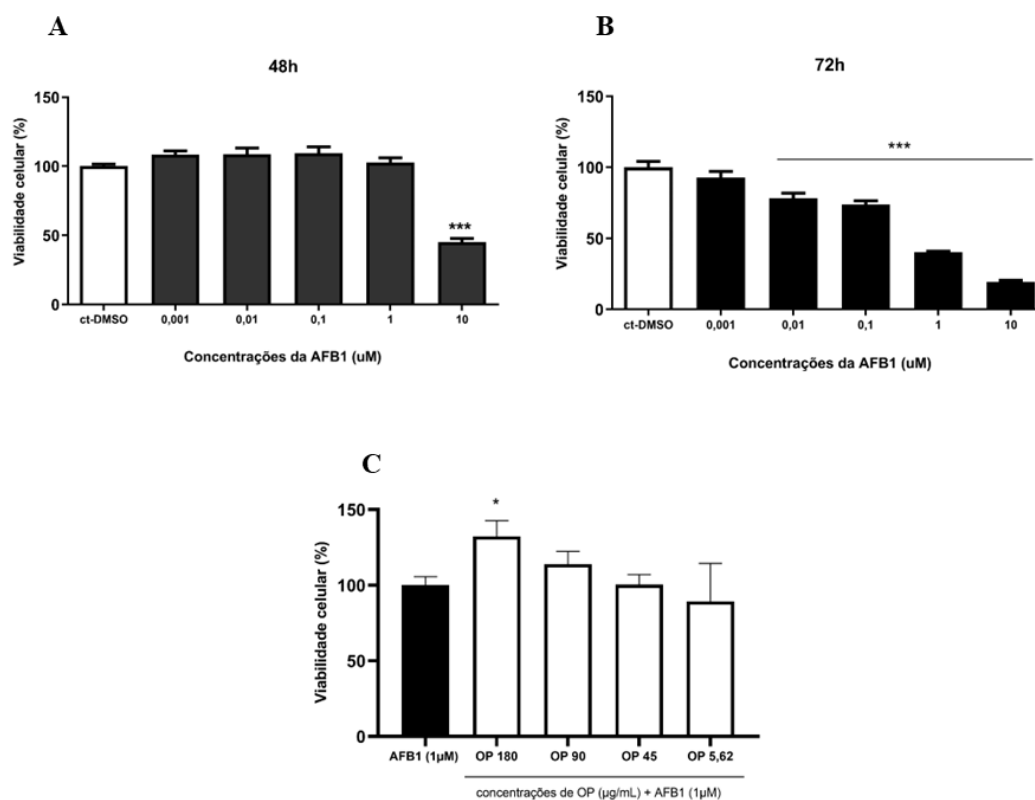


Figura 4. Efeito na viabilidade celular de AML12 após exposição de 48 e 72 horas à AFB1 (A e B) e OP+AFB1 após 48 horas (C) em diferentes concentrações. (A) As concentrações de AFB1 0,001-1 μ M no tempo de 48 horas não apresentaram diferenças estatísticas comparadas ao controle (DMSO). (B) Apenas a concentração de 0,001 μ M não reduziu significativamente a viabilidade celular das células AML12. A concentração de 10 μ M apresentou alta toxicidade nos tempos de 48 e 72 horas para as células AML12. Dados representam os valores das médias \pm DP das 6 replicatas para cada concentração. *** $p < 0,0001$, comparado ao controle veículo (DMSO). (C) Exposição ao OP+AFB1 por 48 horas não reduziu significativamente o crescimento celular de AML12. Dados representam os valores das médias \pm DP das duplicatas (4) para cada concentração. * $p < 0,0483$, comparado a AFB1 (μ M).

4. 1. 3 O óleo de pequi modula a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular das células AML12 expostas AFB1

Para avaliar a capacidade inibitória de OP na proliferação celular da AML12 expostas à OP+AFB1 por 40 ciclos, foi realizado um ensaio de imunomarcagem com bromodesoxiuridina (BrdU), um análogo de timidina, que é incorporado na fase S do ciclo celular, sendo um marcador de síntese de DNA e um excelente marcador de proliferação. A análise estatística mostrou que não há diferença na taxa de proliferação das células AML12 tratadas com AFB1 ou OP+AFB1 comparadas as do controle DMSO (fig.5). Em sequência, também avaliamos a distribuição do ciclo celular pelo ensaio de imunoblotting. Para esta avaliação, utilizamos um coquetel com as proteínas fosforiladas - quinase 2 dependente de ciclina (pCdk2) e Histona H3 (pHH3), marcadores da fase G1/S e M do ciclo celular. A Cdk2 faz parte da família das quinases, proteínas que se ligam as ciclinas e controlam o ciclo celular em mamíferos (Zhang et al.2022), também é necessária para o reparo de danos no DNA causado por agentes mutagênicos (Tadesse et al., 2019). Quando fosforilada pelo resíduo tirosina (Ty15), mantêm-se em estado inativado e sua concentração na fase G1/S, indica parada de ciclo uma vez que ela é necessária para a transição de G1 para fase S. Já a histona H3, é componente importante do nucleossomo e construção da cromatina. A fosforilação de HH3 em serina 10 (Ser10) está associado a condensação dos cromossomos (Elmaci et al., 2018) e sua elevação indica parada na fase M do ciclo celular. Nossos resultados demonstraram que o grupo tratamento OP+AFB1 diminuiu a expressão da Cdk2 pTyr15, que está super expressada no grupo tratamento AFB1, gerando uma parada do ciclo em G1/S neste último grupo. Para a HH3 pSer10 houve uma baixa expressão em todos os grupos tratamentos (fig.6), no entanto em OP+AFB1 houve menor expressão. Uma vez que AFB1 induz parada de ciclo em G1/S e o tratamento com o óleo de pequi não, nós avaliamos a morte celular por apoptose para verificar os efeitos do óleo neste parâmetro. A apoptose foi induzida por H₂O₂ (0,2mM por 30 minutos) e foi pela dupla coloração com os corantes Anexina V

(células apoptóticas) e iodeto de propídio (células necróticas), analisados por citometria de fluxo (Fig. 7A). Por este ensaio encontramos que, AFB1 inibiu apoptose tardia, comparado ao controle (DMSO). No entanto, o óleo de pequi, estatisticamente, não apresentou diferença em relação ao controle (DMSO) e ao grupo tratamento com AFB1 (fig. 7C). A necrose, em ambos os grupos não apresentou diferenças estatísticas (fig 7D). Esses resultados mostram que o efeito de OP estão relacionados com a inibição dos efeitos tóxicos de AFB1 que levaram a parada do ciclo celular em G1/S, mas não interfere na apoptose. Também o resultado da apoptose explica em parte por que a AFB1 mesmo tendo um atraso no ciclo celular, mantém o índice proliferativo semelhante ao controle (DMSO).

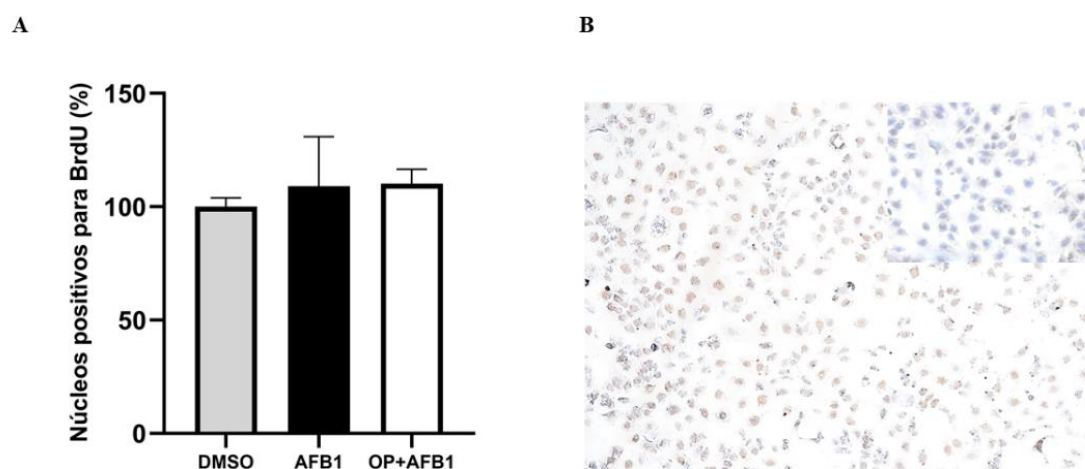


Figura 5 – Análise da capacidade proliferativa das células AML12 expostas à AFB1 (1 μ M) e combinação de AFB1 mais 5,62 μ g/mL de óleo de pequi (OP+AFB1) por 40 ciclos. O índice proliferativo foi mensurado pela porcentagem de núcleos positivos para BrdU (10 μ M) incorporado pelas células nos diferentes tratamentos e não houve diferença entres os grupos (A). (B) imagem representativa de núcleos positivos e negativos para BrdU, no recorte controle negativo da reação, no aumento de 10x. O DMSO (0,01%) foi usado como veículo nas células controles. *One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Kruskal-Wallis que comparou o controle com os tratamentos. Diferenças estatísticas foram aceitas quando $p \leq 0,05$.

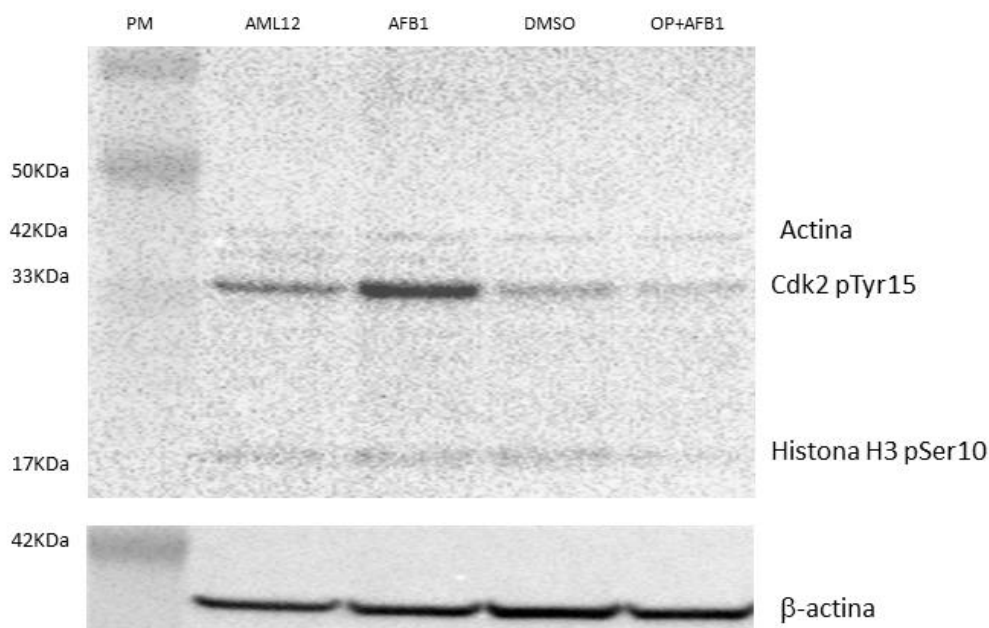


Figura 6 – Imunoblotting do efeito do óleo de pequi na expressão de pCdk2 e pHH3, proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular em células AML12 expostas à AFB1 (1 μ M) por 40 ciclos. Aumento de cdk2pTyr15 – significa parada em G1/S; Histona H3pSer10 elevada indica parada na fase M. β -actina (controle endógeno).

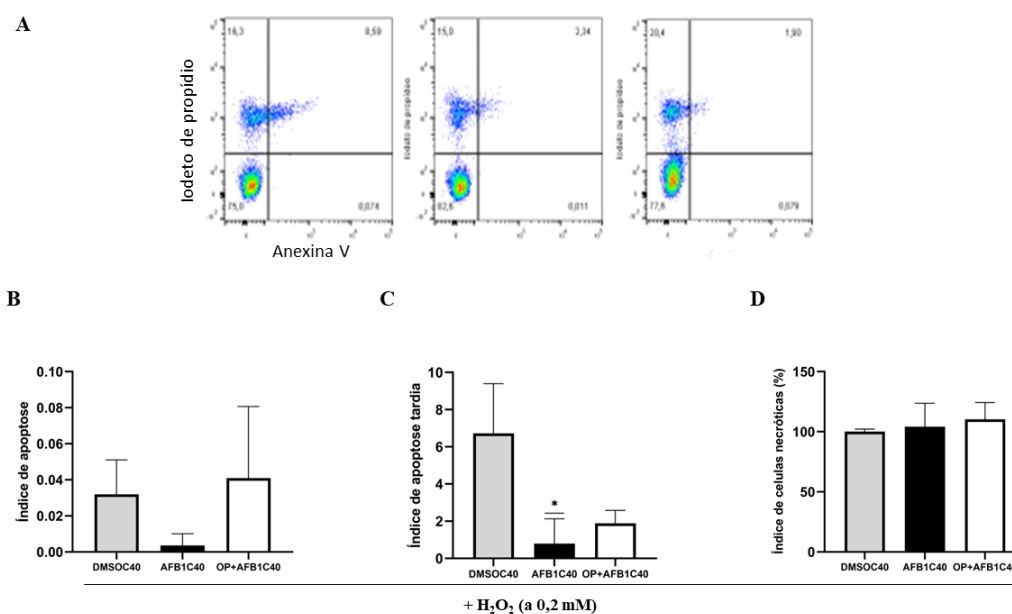


Figura 7 – Efeito de AFB1 (1 μ M) e OP+AFB1 na morte celular de AML12 exposta ao tratamento por 40 ciclo (72h cada ciclo). (A) Representação da análise de citometria de fluxo, onde as células foram duplamente coradas com anexina V (células apoptóticas) e iodete de propídio (células mortas). (B) Quantificação de células apoptóticas (anexina V⁺/IP⁻) onde não houve diferença entre

os grupos e (C) inibição de apoptose tardia (Anexina V⁺/PI) no grupo AFB1 comparado ao controle. * $p < 0,02$. (D) O índice necrótico (Anexina V⁻/PI⁺) não houve diferenças entre os grupos. O DMSO (0,01%) foi usado como veículo nas células controles. *One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Kruskal-Wallis que comparou o controle com os tratamentos. Os valores são expressos como médias \pm DP de triplicatas.

4. 1. 6 O óleo de pequi inibi a geração de ROS intracelular e altera expressão de proteínas do sistema de defesa antioxidante de AML12 expostas à AFB1

A geração de ROS intracelular nas células AML12 expostas à AFB1, tratadas e não tratadas com OP, foi avaliada utilizando o fluorogênico DCFDA para verificar se o sistema de defesa antioxidante foi afetado pelo tratamento. As células foram expostas ao H₂O₂ (a 0,2 mM) por 30 minutos para simular uma condição oxidativa e a geração de ROS mensurada. Os dados mostraram diminuição significativa na geração de ROS nas células tratadas com OP+AFB1 comparada às células tratadas apenas com AFB1 (fig. 8A). Uma vez que a geração de ROS está diminuída no grupo tratamento OP+AFB1, verificamos pelo ensaio de *western blotting* a expressão da proteína superóxido dismutase 1 (SOD1), que está envolvida na proteção das células contra o estresse oxidativo e a regulação de ROS. O resultado do imunoblotting mostrou que no grupo tratamento OP+AFB1, SOD1 está discretamente mais expressa que nos demais grupos (fig. 8B). Também verificamos a expressão de SOD1 e catalase, por imunofluorescência, ambas de marcação citoplasmática. Para a catalase, observamos marcação mais intensa no grupo OP+AFB1 comparado ao grupo tratamento com apenas AFB1 (fig. 9). Porém, para SOD1, não é possível observar diferenças no padrão de marcação entre os grupos tratamentos. O resultado sugere que OP inibe o estresse oxidativo, possivelmente porque preserva a capacidade de defesa antioxidante endógena, capacidade afetada negativamente pela AFB1.

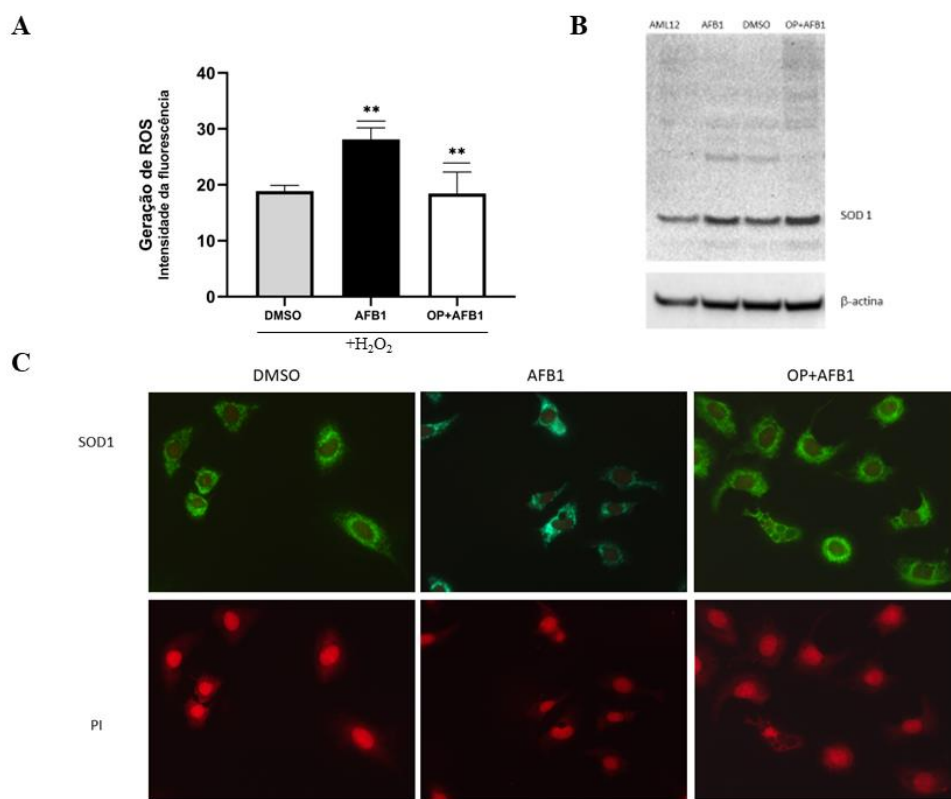


Figura 8 – Inibição da formação de ROS nas células AML12 tratadas com OP+AFB1 (A-C) por 40 ciclos e desafiadas com peróxido de hidrogênio simulando condição pró-oxidativa. (A) quantificação de ROS, células expostas ao H_2O_2 (0,2mM) por 30 minutos antes da quantificação. Dados representam os valores das médias \pm DP das 5 replicatas (ROS intracelular) para cada tratamento. ** $p < 0,002$ comparado ao tratamento AFB1. (B) Representação de *Western blotting* mostrando os níveis da proteína superóxido dismutase 1(SOD1) em células tratadas com OP+AFB1 e AFB1. (C) Imunofluorescência para SOD1. Em verde anti-SOD1 (1:300) e iodeto de propídio em vermelho. Imagem visualizada na objetiva de 60x.

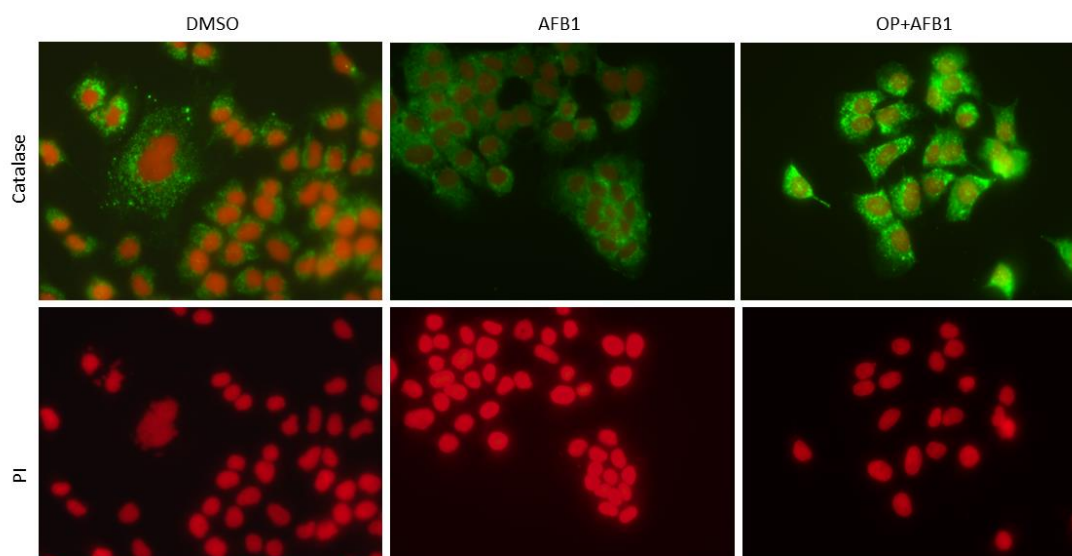


Figura 9 – Aumento da expressão de Catalase em células AML12 tratadas com AFB1 (1 μ M) e combinação de AFB1 mais 5,62 μ g/mL de óleo de pequi (OP+AFB1) por 40 ciclos (72 horas cada ciclo). Em verde anti-catalase (1:200) e iodeto de propídio em vermelho. DMSO (controle veículo); AFB1 (células tratadas com aflatoxina B1 1 μ M/mL); AFB1+OP (células tratadas com aflatoxina B1 [1 μ M/mL] e óleo de pequi [5,6 μ g/mL]). Objetiva de 60x.

4. 2 Avaliação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) no estresse oxidativo e danos no DNA em linhagem de carcinoma hepatocelular humano - HepG2

Para avaliar o efeito do óleo de pequi (OP) na inibição do estresse oxidativo e danos no DNA na linhagem de hepatocarcinoma HepG2, o óleo foi testado em duas concentrações diferentes (90 e 180 μ g/mL). Estas concentrações foram escolhidas com base em estudos (ainda não publicados) conduzidos em parceria com a prof^a Dr^a Graziella Anselmo Joanitti e prof. Dr^a Cesar K. Grisolia, da Universidade de Brasília – UnB. Para que os resultados possam ser comparados futuramente, tanto as concentrações quanto a forma de solubilização do óleo foram padronizadas.

4. 2. 1 O tratamento com óleo de pequi altera o conteúdo lipídico intracelular, mas não afeta a viabilidade celular na linhagem HepG2

Para avaliar o efeito citotóxico do óleo de pequi na linhagem HepG2, as células foram tratadas com 90 e 180 $\mu\text{g/mL}$ do óleo por 24, 48 e 72 horas. O ensaio do MTT foi realizado para avaliar a viabilidade da cultura. Como controle do veículo foi utilizado 0,2% de etanol. Os resultados mostraram que a viabilidade celular da HepG2 não foi afetada em nenhuma das duas concentrações e tempos testados do óleo de pequi (fig. 10 A-C). Para a avaliação de acúmulo lipídico intracelular na linhagem HepG2, as células foram tratadas com óleo de pequi nas mesmas concentrações anteriormente citadas por 24 horas e coradas com o corante fluorescente vermelho de Nilo (0,25 mg/mL). A mensuração da fluorescência foi realizada em leitor de placa fluorescente e demonstrou que o tratamento com o óleo de pequi aumenta, em todas as concentrações testadas, significativamente a quantidade de lipídios intracelular, quando comparado ao controle (fig.10 D). O acúmulo é proporcional ao aumento da concentração, sugerindo que em doses não adequadas o óleo de pequi pode causar esteatose.

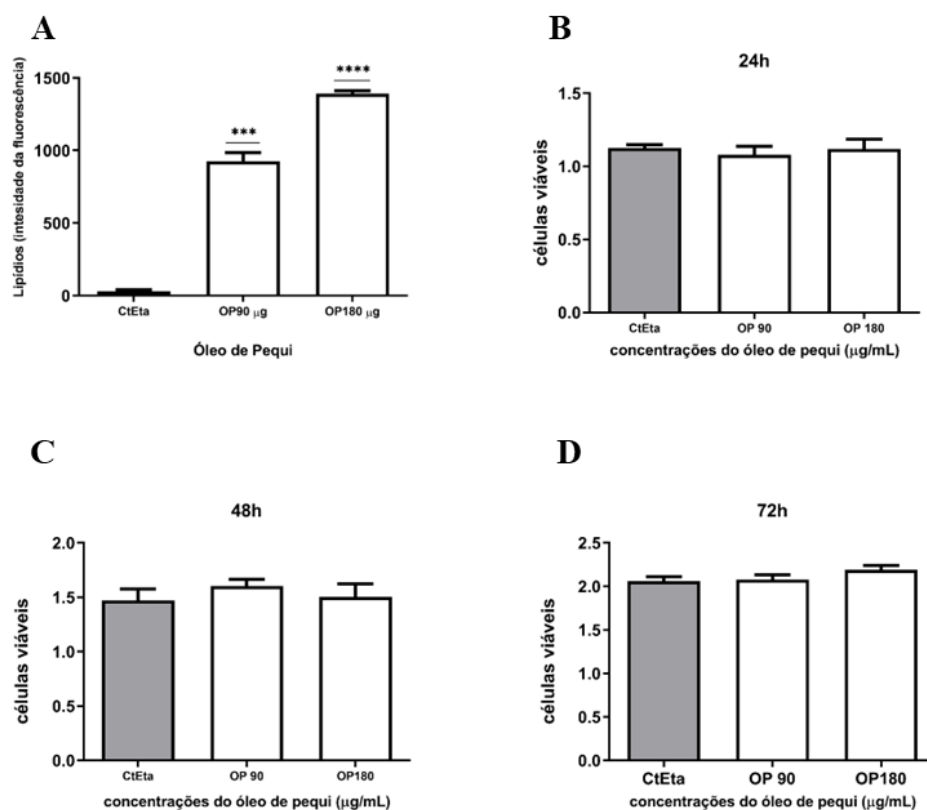


Figura 10 – Efeito do óleo de pequi no crescimento celular da linhagem HepG2 após incubação de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C) e no acúmulo de gordura intracelular (D) com o óleo nas concentrações de 90 e 180 µg/mL. Dados representam os valores das médias ± DP das sextuplicata para cada concentração. $p < 0,051$; $***p < 0,0001$ comparado ao controle CtEt (controle etanol 0,2%).

4. 6. 2 Óleo de pequi inibe a geração de espécies reativas de oxigênios (ROS) intracelular na HepG2

Para observar o efeito do óleo de pequi na geração de ROS, as células HepG2 foram pré-tratadas por 24 horas nas concentrações de 90 e 180 µg/mL de OP e na sequência foram expostas a 0,2 mM de H₂O₂. Os resultados (fig. 11) mostraram diminuição significativa de ROS na concentração de 90 µg/mL de OP comparado ao controle (H₂O₂), indicando que o efeito é dose-dependente.

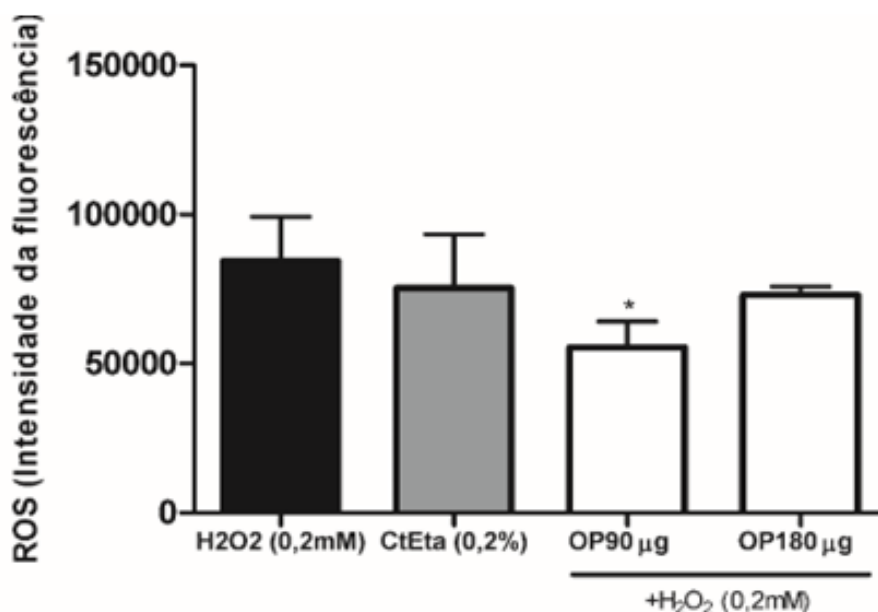


Figura 11. Efeito protetor de OP na geração de ROS em células HepG2. Pré-tratamento com óleo de pequi (OP) por 24 horas e seguida de exposição ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2 a 0,2 mM). Dados representam os valores das médias \pm DP das sextuplicata para cada concentração no ensaio de ROS. * $p < 0,05$ comparada ao controle (H_2O_2).

4. 2. 4 O óleo de pequi reduz quebras na fita do DNA induzidas por peróxido de hidrogênio em células HepG2

Para determinar o efeito do óleo de pequi contra danos oxidativos no DNA induzido pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foi realizado o ensaio do cometa em dois diferentes protocolos de tratamentos (descrito na seção de métodos 3. 3. 4. 1). O parâmetro momento da cauda (% de DNA na cauda x comprimento da cauda) foi selecionado como indicador de dano ao DNA e foi reduzido no tratamento com o óleo de pequi pós indução do dano, nas duas concentrações de OP testadas (fig. 12A). Porém, no pré-tratamento não houve diferença estatística nas duas concentrações testadas quando

comparadas ao controle (fig. 12B), sugerindo efeito do óleo pequi no reparo ao dano no DNA.

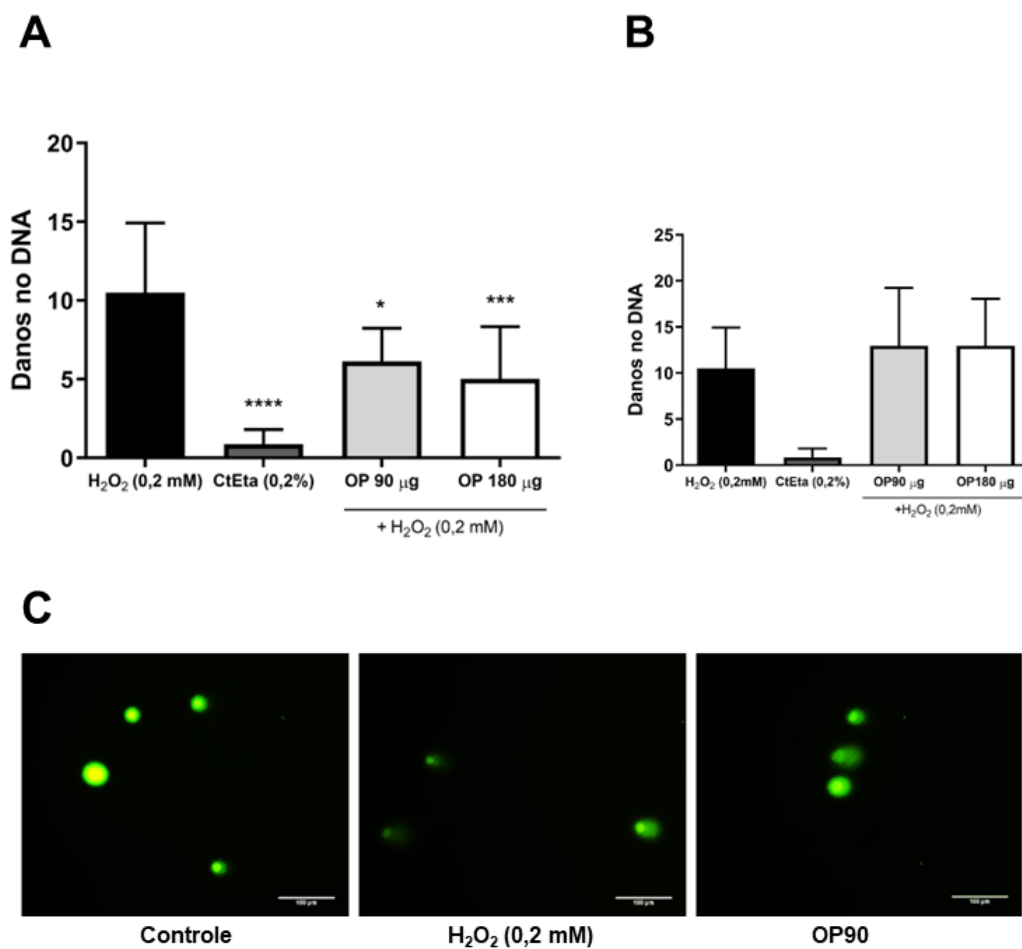


Figura 12. Efeito do óleo de pequi na redução do dano ao DNA de células HepG2, induzidos por H₂O₂ (0,2 mM) pós-tratamento (A) e pré-tratamento (B). (C) Representação dos cometas nos grupos tratamentos com OP pós-indução com o carcinógeno. Mensuração é do parâmetro momento da cauda (% de DNA da cauda X comprimento da cauda), onde um mínimo de 50 cometas por tratamento foi mensurado. Os valores são expressos como média ± DP das triplicatas para cada tratamento. *** $p < 0,0005$, comparado ao controle.

Discussão

5 Discussão

Neste estudo, nós buscamos identificar os mecanismos do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb) na inibição da carcinogênese hepática, pois, em estudo anterior, usando modelo em camundongos, demonstramos que o óleo de pequi (OP) inibe lesões pré-neoplásicas e neoplásicas (Palmeira et al., 2016). Aqui, encontramos que o óleo inibe estresse oxidativo e danos no DNA. Nas células AML12 expostas à aflatoxina (AFB1) o óleo de pequi reduziu a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e expressão de pCdk2 (Tyr15), forma inativada da quinase, enquanto aumentou a expressão da proteína catalase, uma proteína das defesas antioxidantes endógenas. Nas células HepG2 expostas ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o óleo também diminuiu a geração de ROS, reforçando seu efeito protetor ao estresse oxidativo e reduziu quebras nas fitas de DNA quando as células foram tratadas com OP pós indução ao dano, indicando seu efeito antígeno-tóxico e sugerindo indução de reparo do DNA.

Modelos *in vitro* são importantes para o estudo de mecanismos celulares e moleculares. Para que pudéssemos estudar os mecanismos preventivos do óleo de pequi no desenvolvimento da carcinogênese hepática, nós utilizamos um modelo *in vitro* e usamos a aflatoxina b1 (AFB1) como carcinógeno. A AFB1 é um potente hepatocarcinógeno genotóxico, que também pode causar tumores em outros órgãos (Vinken et al. 2008; Singh et al. 2015; Ferreira et al. 2019). Ela é um produto do metabolismo secundário de fungos da espécie *Aspergillus flavus*, comumente encontrada como contaminante em diversos alimentos e sua ingestão é associada ao carcinoma hepatocelular (CHC) (IARC, 2002; Haila Abassi et al. 2016; Yaqi Dai et al. 2017). Sua bioativação ocorre no fígado (principal sítio de seu metabolismo) mediado pelo citocromo

p450 (CYP450), resultando em intermediários reativos que se ligam a macromoléculas como DNA (formando aductos) e RNA, e a organelas celulares. Além disso, AFB1 promove aumento da produção de ROS (Yaqi Dai et al. 2017; Zhang et al., 2020), parada de ciclo celular (Huang et al., 2020) e em último caso pode levar a dano ou morte celular (Ribeiro, 2005). Ela pode induzir carcinogênese tanto em modelos *in vivo* como em modelos *in vitro* (Wang et al. 2017; Shing et al. 2015; Pang et al. 2008). Considerando esses efeitos da AFB1 e sua importante relação com o CHC, nós a elegemos como carcinógeno para esse estudo. Em altas concentrações, AFB1 foi citotóxica para as células HCT116 de carcinoma de cólon humano, porém em doses menores ela induziu proliferação celular após 24 a 120 horas de exposição (Abassi et al., 2016). Portanto, com base na avaliação da toxicidade de AFB1, foi escolhida a concentração de 1µM/mL, pois não afetou a viabilidade celular no tempo de exposição de 48 horas o que poderia levar a um aumento da proliferação das células AML12 após 40 ciclo de exposição. No entanto, quando avaliamos o índice proliferativo por imunomarcagem de BrdU, não identificamos aumento, mesmo utilizando uma concentração baixa, resultado também encontrado por outro estudo reportado na literatura sobre AFB1 (Gursoy-Yuzugullu et al. 2011). Embora, não obtendo células com capacidade proliferativa aumentada, o tratamento com aflatoxina b1 causou danos, o que induziu distúrbios nas células AML12. Elas apresentaram alterações no ciclo celular, apoptose e defesas antioxidantes, que mostra que o modelo foi útil para avaliar o efeito do óleo de pequi nesses parâmetros. Alterações no ciclo celular, morte celular e defesas ao estresse oxidativo tem relação com desenvolvimento da carcinogênese (Referenciar).

A metabolização da AFB1 gera um composto reativo, o 8,9-óxido de AFB1, que pode ligar-se ao DNA ou proteínas formando adutos (Gursoy-Yuzugullu et al. 2011). Além disso, AFB1 promove aumento da produção de radicais livres como ROS

intracelular, que leva ao estresse oxidativo e pode gerar danos oxidativos, inclusive ao DNA (Yilmaz, Kaya e Kisacam, 2016). Lesões no DNA induz resposta celular para ativar pontos de checagem em diferentes fases do ciclo pela inibição de quinases dependentes de ciclina (CDK), importantes reguladores do ciclo celular (Bačević et al., 2017). Essa parada no ciclo, possibilita reparar o dano na molécula de DNA. Neste estudo, segundo a análise de distribuição das fases do ciclo celular por imunoblotting, a expressão de Cdk2 pTyr15 foi super expressa no tratamento com AFB1. A Cdk2 é mantida em um estado inativado em G1/S por fosforilação inibitória em Tyr15 e é requerida para a transição de G1/S. Essa expressão elevada de Cdk2 pTyr15 indica que aflatoxina b1 induziu parada do ciclo celular em G1/S, o que possivelmente está relacionado com danos ao DNA. Estudos anteriores mostraram que exposição à aflatoxina B1 leva parada no ciclo celular pela ativação dos pontos de checagens do DNA, em resposta ao dano (Bianco, 2012; Guan et al. 2019; Huang et al., 2020). Ainda assim, esse bloqueio no ciclo não afetou o crescimento celular das AML12 expostas à AFB1, pois, observamos índices proliferativos semelhantes entre os grupos tratamentos e controle. Ao contrário de AFB1, o óleo de pequi super reduziu a expressão de Cdk2 pTyr15, indicando que OP inibe os efeitos de AFB1 que levam a parada da divisão celular em AML12, levando-as a se dividirem normalmente. Esse efeito pode estar relacionado a inibição de danos ou indução de reparo dos danos no DNA das células AML12 expostas à AFB1. O óleo de pequi é rico em carotenoides (Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya, 2004; Miranda-Vilela et al., 2011a, b), um potente antioxidante, que está relacionado com redução do risco de doenças degenerativas e câncer (Britton, 1995; Rodriguez-Amaya, 1997; Ramos et al., 2001). Por exemplo, em estudo anterior, o óleo de pequi reduziu danos oxidativos no DNA induzidos por exercício físico em atletas (Miranda-Vilela, 2011). Aqui, nós também encontramos reduções de quebras nas fitas de DNA de células HepG2 expostas ao peróxido de

hidrogênio e tratadas com óleo de pequi (fig. 12^a), mostrando que essa hipótese é consistente. Quando há uma quantidade excessivas de danos no DNA e na impossibilidade de reparo desses danos, são ativados os processos de senescência ou morte celular por apoptose. Porém, o óleo não se mostrou eficiente para induzir apoptose nas células AML12 expostas à aflatoxina, enquanto o tratamento com AFB1 inibiu apoptose tardia (células positivas para Anexina e PI). Vários estudos, em diferentes tipos celulares, relatam que um dos efeitos tóxicos de AFB1 é induzir apoptose (Mughal et al., 2017; Zhang et al., 2020; Zhou et al., 2021). Entretanto, estes estudos utilizaram concentrações bastante elevadas de AFB1, o que poderia explicar a diferença nos nossos resultados.

Uma vez que a exposição à aflatoxina está relacionada com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Ribeiro, 2005; Rieswijk et al. 2016; Yaqi Dai et al. 2017) e que as defesas antioxidantes endógenas também são afetadas (Singh et al., 2014; Huang et al., 2020), nós avaliamos o efeito do óleo de pequi nas células expostas à AFB1 quanto a geração de ROS. Entretanto, nós simulamos uma condição pró-oxidante, onde expomos as células ao peróxido de hidrogênio após o fim dos 40 ciclos de tratamentos para verificar se o sistema de defesa antioxidante foi afetado. Encontramos que as células tratadas apenas com AFB1 tiveram os níveis de ROS aumentados, enquanto o óleo de pequi reduziu a geração de ROS intracelular a níveis do controle. Quando avaliamos por imunomarcagem a expressão de catalase, enzima do sistema antioxidante que remove H₂O₂, observamos uma maior expressão no grupo tratamento com o óleo. Porém, no ensaio de imunoblotting, a marcação de SOD1 apresentou um leve aumento. Esses dados indicam que o sistema de defesa antioxidante das células AML12 foram afetadas pela AFB1 e que o óleo de pequi foi eficiente em proteger as defesas antioxidantes endógenas mantendo os níveis de ROS semelhantes aos do controle. Este dado é bastante relevante

pois níveis elevados de ROS tem relação com diversas doenças, entre elas, surgimento de neoplasias.

Neste estudo também apresentamos os resultados do efeito do óleo de pequi no estresse oxidativo na linhagem de carcinoma hepatocelular humano HepG2, usando dois marcadores, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular e o dano oxidativo no DNA. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com óleo na concentração de 90 µg/mL, inibe significativamente a geração de ROS induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Quando administrado simultaneamente com a aflatoxina B1 (AFB1), o óleo também é capaz de reduzir significativamente a geração de ROS, porém apenas na menor concentração (90 µg). Estes resultados confirmam a atividade antioxidante do óleo de pequi já observada na linhagem AML12 exposta à aflatoxina e em outros trabalhos. Esta capacidade de detoxificação de ROS, porém, foi de modo concentração-dependente, sugerindo que o óleo de pequi pode ser efetivo em doses adequadas na proteção contra o estresse oxidativo causados pelo excesso da geração de ROS em hepatócitos. O excesso na geração de ROS pode comprometer a estrutura de macromoléculas como o DNA, lipídios e proteínas, também super estimular algumas vias intracelulares desencadeando vários processos patológicos (Yang e Lee, 2015; Berra et al., 2013). No câncer, estas espécies reativas de oxigênio participam de mecanismo como sinalização celular, proliferação, invasividade, angiogênese e metástase tumoral (Yang e Lee, 2015). No fígado, níveis elevados de geração de ROS e o dano oxidativo no DNA foram associados à hepatocarcinogênese (Chuma et al., 2008). Tratando camundongos inoculados com tumor de Erlich, Miranda et al. (2011) demonstrou que o óleo de pequi administrado antes da inoculação foi capaz de reduzir o crescimento tumoral. Em outro estudo, os mesmos autores também avaliaram o efeito de suplementação antioxidante com óleo de pequi no dano oxidativo induzido por doxorrubicina, um quimioterápico que

gera altos níveis de ROS. Os autores mostraram que o óleo de pequi também foi capaz de reduzir o crescimento do tumor e os efeitos adversos associados ao dano oxidativo induzidos pelo quimioterápico às células normais dos camundongos inoculados com tumor de Erlich (Miranda et al. 2014). O dano oxidativo no DNA é a principal fonte de mutações genéticas e está relacionado a várias doenças (Gros et al. 2002). No fígado está associado ao desenvolvimento da carcinogênese hepática (Chuma et al., 2008). Nós avaliamos o efeito anti-genotóxico do óleo de pequi pelo ensaio do cometa e os dados mostraram que o óleo inibe os danos oxidativo ao DNA induzido por (H_2O_2) quando administrado pós-indução nas duas concentrações avaliadas (90 e 180 μ g). Este efeito foi mais proeminente na maior concentração (180 μ g/mL). Porém esta concentração não apresentou efeito inibitório significativo na geração de ROS. Este resultado indica que o efeito do óleo na inibição do dano ao DNA induzido por (H_2O_2) pode não estar apenas relacionado à detoxificação de ROS, mas também por uma possível modulação do sistema de reparo do DNA das células HepG2. Em estudo anterior realizado por nós, quando tratamos camundongos com dietilnitrosamina (DEN), um agente mutagênico, o óleo de pequi administrado pós-indução também apresentou efeito protetor contra lesões hepáticas pré-neoplásicas (Palmeira et al. 2016). Estudos têm relatado a capacidade dos antioxidantes naturais de estimular o sistema de reparo do DNA. Niture et al. (2007) demonstraram que os antioxidantes de plantas, curcumina e o resveratrol, possuem habilidades para aumentar a expressão da O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), uma proteína de reparo do DNA, que protege o material genético contra ação de mutagênicos. Ainda sobre os antioxidantes naturais em interferir no reparo do DNA, Bakheet et al. (2016) reportaram que o tratamento com a proantocianidina melhorou a expressão de genes específicos do reparo do dano genotóxico afetados pelo tratamento com aflatoxina B1 em ratos. O pequi é rico em compostos carotenoides, os quais também

já foram encontrados atuando no reparo do dano do DNA. Em estudo realizado por Herrero-Barbudo et al. (2013) o carotenoide luteína melhorou a resistência do DNA a danos e a sua capacidade de reparo em linfócitos humanos.

O tratamento com o óleo de pequi aumentou a quantidade de lipídios intracelular de modo concentração-dependente, porém não inibiu o crescimento celular. Este resultado pode estar relacionado ao conteúdo de ácidos graxos presentes no óleo. Altas concentrações de ácidos graxos livres aumentam a expressão de enzimas (CYP 2E1) envolvidas na β -oxidação dos ác. graxos. O aumento na geração de ROS como produtos da β -oxidação leva a várias desordens nos hepatócitos como peroxidação lipídica, danos às proteínas, DNA e apoptose (Morris et al. 2011; Takaki et al. 2013). No entanto, nossos resultados demonstraram que o acúmulo de gordura não afetou a viabilidade celular da HepG2 como também não aumentou a geração de ROS comparado ao controle. Ricchi et al. (2009) avaliaram o papel dos ácidos oleico e palmítico na esteatogênese e apoptose em um modelo de esteatose *in vitro*. Utilizando três linhagens de hepatócitos, entre elas a HepG2, os autores demonstraram que o tratamento com ácido palmítico aumentou o número de células apoptóticas enquanto ácido oleico mesmo nas maiores concentrações não induziu apoptose alguma, comparado aos controles não tratados. Quando administrados os dois ac. graxos simultaneamente, os autores observaram um efeito protetor do ácido oleico na apoptose induzida pelo ácido palmítico. O óleo de pequi possui em sua composição os dois ácidos graxos, porém a concentração de ácido oleico (54,28%) é mais alta que ácido palmítico (44,93%) (Miranda-Vilela et. al, 2014), o que pode explicar não termos observado alteração significativa na viabilidade celular da HepG2 neste estudo. No entanto, em estudos futuros será interessante se aprofundar nesta questão.

Conclusão

6 Conclusão

Concluimos que, o óleo de *C. brasiliense* age quimiopreventivamente na inibição do estresse oxidativo e na proteção do material genético contra danos oxidativos em hepatócitos, pois, reduz geração de espécies reativas (ROS), possivelmente por preservar as defesas antioxidantes endógenas, e pela diminuição de quebras nas fitas do material genético. Portanto, o óleo de pequi possui potencial para ser aplicado na prevenção do câncer hepático, uma vez que protege a integridade genômica.

Referências

7 Referências

- Almeida SP (1998). Frutas nativas do cerrado: caracterização físico química e fonte potencial de nutrientes. In: Sano SM, Almeida SP, editors. Cerrado: Ambiente e flora. Planaltina: Embrapa-CPAC. pp. 247–285.
- Almeida SP, Silva JA (1994). Pequi e Buriti – Importância alimentar para a população dos Cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC.
- Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF (2000). Cerrado: espécies vegetais úteis, 3th ed. Planaltina: Embrapa-CPAC.
- Angeli JP, Barcelos GR, Serpeloni JM, Barbosa F Jr, Nersesyan A, Mantovani MS. Evaluation of the genotoxic and anti-genotoxic activities of silybin in human hepatoma cells (HepG2). *Mutagenesis*. 2010 May;25(3):223-9. doi: 10.1093/mutage/geb064. Epub 2009 Dec 23. PMID: 20032005.
- Aquilano, K., Vigilanza, P., Rotilio, G. and Ciriolo, M.R. Mitochondrial damage due to SOD1 deficiency in SH-SY5Y neuroblastoma cells: a rationale for the redundancy of SOD1. *The FASEB Journal*. 2006; 20: 1683-1685. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5225fje>
- Azevedo-Meleiro CH, Rodriguez-Amaya DB. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *J Food Compos Anal* 2004;17:385–96.
- Bakheet SA, Alhuraishi AM, Al-Harbi NO, Al-Hosaini KA, Al-Sharary SD, Attia MM, Alhoshani AR, Al-Shabanah OA, Al-Harbi MM, Imam F, Ahmad SF, Attia SM. Alleviation of Aflatoxin B1-Induced Genomic Damage by Proanthocyanidins via Modulation of DNA Repair. *J Biochem Mol Toxicol*. 2016; 30(11):559-566. doi: 10.1002/jbt.21823
- Bačević, K., Lossaint, G., Achour, T.N. et al. Cdk2 strengthens the intra-S checkpoint and counteracts cell cycle exit induced by DNA damage. *Sci Rep*. 2017; 7, 13429. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12868-5>
- Berra CM, Oliveira CS, Garcia CCM, Rocha CRR, Lerner LK, Lima LCA, Baptista MS, Menck CF. Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. *Free Radical Biology and Medicine* 2013; 61:343–356.
- Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsia e perspectivas. *Química Nova*. 2007; 30(2):441-449.
- Chuma M, Hige S, Nakanishi M, Ogawa K, Natsuizaka M, Yamamoto Y, Asaka M. 8-Hydroxy-2'-deoxy-guanosine is a risk factor for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008; 23(9):1431-1436.
- Diaz G, Melis M, Batetta B, Angius F, Falchi AM. Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron*. 2008 Oct;39(7):819-24. doi: 10.1016/j.micron.2008.01.001

Donato M.T., Tolosa L., Gómez-Lechón M.J. (2015) Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. In: Vinken M., Rogiers V. (eds) *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. 2015; v1250. Humana Press, New York, NY.

Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ, Huang TT. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*. 2005 Jan 13;24(3):367-80. doi: 10.1038/sj.onc.1208207. PMID: 15531919.

Elmaci İ, Altinoz MA, Sari R, Bolukbasi FH. Phosphorylated Histone H3 (PHH3) as a Novel Cell Proliferation Marker and Prognosticator for Meningeal Tumors: A Short Review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018 Oct;26(9):627-631. doi: 10.1097/PAI.0000000000000499. PMID: 28777144.

Enes BN, Cardoso LM, Castro PM, Cesário CC, Sant'Ana HMP, Moreira AVB, et al. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): perfil de carotenóides, vitaminas e Atividade antioxidante. *Nutrire*. 2011; 36:17–17.

Eraslan G, Sarıca ZS, Bayram LÇ, Tekeli MY, Kanbur M, Karabacak M. The effects of diosmin on aflatoxin-induced liver and kidney damage. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017 Dec;24(36):27931-27941. doi: 10.1007/s11356-017-0232-7. Epub 2017 Oct 8. PMID: 28988357.

Facioli NL, Golçalves LAG. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). *Quím nova*. 1998; 21:16–19.

Fidrianny, I.; Windyaswari, A.S.; Wirasutisna, K.R. Antioxidant capacities of Various leaves extract from five colors varieties of sweet potatoes tubers using ABTS, DPPH assays and correlation with total flavonoid, phenolic, carotenoid content. *Research Journal of Medicinal Plant*. 2013; 7 (3): 130-140.

Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*. 1997; 272(30):18515-7. doi: 10.1074/jbc.272.30.18515. PMID: 9228011.

Gomaa AI, Waked I. Recent advances in multidisciplinary management of hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2015; 7(4): 673-687.

Gros L, Saporbaev MK, Laval J. Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene*. 2002; 21: 8905 – 8925

Gursoy-Yuzugullu O, Yuzugullu H, Yilmaz M, Ozturk M. Aflatoxin genotoxicity is associated with a defective DNA damage response bypassing p53 activation. *Liver Int*. 2011; 31(4):561-71. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02474.x. Epub 2011 Feb 15. PMID: 21382167.

Haila Abassia, Imen Ayed-Boussemaa, Sarah Shirleyb, Salwa Abida, Hassen Bachaa, Olivier Micheaub. The mycotoxin zearalenone enhances cell proliferation, colonyformation and promotes cell migration in the human colon carcinoma cell line HCT116. *Toxicology Letters*. 2016; 254: 1–7.

- Halliwell B, Adhikary A, Dingfelder M, Dizdaroglu M. Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage in vivo. *Chem Soc Rev.* 2021; 50(15):8355-8360. doi: 10.1039/d1cs00044f. Epub 2021 Jun 15. PMID: 34128512; PMCID: PMC8328964.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-74.
- Hasegawa Y, Takano T, Miyauchi A, Matsuzuka F, Yoshida H, Kuma K, Amino N. Decreased expression of glutathione peroxidase mRNA in thyroid anaplastic carcinoma. *Cancer Lett.* 2002 182:69–74
- Huang B, Chen Q, Wang L, Gao X, Zhu W, Mu P, Deng Y. Aflatoxin B1 Induces Neurotoxicity through Reactive Oxygen Species Generation, DNA Damage, Apoptosis, and S-Phase Cell Cycle Arrest. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(18):6517. doi: 10.3390/ijms21186517. PMID: 32899983; PMCID: PMC7554769.
- Kaemmerer E, Tayner E, Garzon R, Lock AM, Lovitt CJ, Avery, VM. Innovative in vitro models for breast cancer drug discovery. *Drug Discovery Today: Disease Models.* 2016; v 21.
- Lee TK, Guan XY, Ma S. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma - from origin to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022; 19(1):26-44. doi: 10.1038/s41575-021-00508-3. Epub 2021 Sep 9. PMID: 34504325.
- Li S, Tan H-Y, Wang N, Zhang Z-J, Lao L, Wong C-W, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences [Internet].* 2015; 16(11):26087–124. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms161125942>
- Lima A, Silva AMO, Trindade RA, Torres RP, Mancini-Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (Caryocar brasiliense Camb.). *Rev Bras Frutic.* 2007; 29:695–698.
- Liu Z, Cheng M, Cao MZ. Potential targets for molecular imaging of apoptosis resistance in hepatocellular carcinoma. *Biomed Imaging Interv J.* 2011; 7(1): doi: 10.2349/bij.7.1.e5
- Llovet, J. M, Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E. *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16018 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.18>
- Llovet, J.M., Kelley, R.K., Villanueva, A. *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 7, 6 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- Menecier G, Torres LN, Cogliati B, Sanches DS, Mori CM, Latorre AO, Chaible LM, Mackowiak II, Nagamine MK, Da Silva TC, Fukumasu H, Dagli ML Chronic exposure of lung alveolar epithelial type II cells to tobacco-specific carcinogen NNK results in malignant transformation: a new in vitro lung carcinogenesis model. *Mol Carcinog.* 2014; 53(5):392-402.
- Miyaniishi K, Hoki T, Tanaka S, Kato J. Prevention of hepatocellular carcinoma: Focusing on antioxidant therapy. *World J Hepatol.* 2015; 7(3): 593-599.

Miranda-Vilela AL, Zaidan-Alves PC, Akimoto AK, Souza-Lordelo G, KlautauGuimarães MN, Grisolia CK. Under increased hydrogen peroxide conditions, the antioxidant effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) to decrease DNA damage in runners are influenced by sex, age and oxidative stress-related genetic polymorphisms. *Free Radic Antioxid*. 2011a; 1:27–39.

Miranda-Vilela AL, Portilho FA, Araújo VGB, Estevanato LLC, Mezzomo BP, Santos MFMA, Lacava ZGM. (2011b). The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumor bearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations. *J Nutr Biochem*. 2011b; 2: 1091–1098.

Miranda-Vilela AL, Grisolia CK, Longo JPF, Peixoto RCA, Almeida MC, Barbosa LCP, Roll MM, Portilho FA, Estevanato LLC, Bocca AL, Bão SN, Lacava ZGM. Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. *J Nutr Biochem*. 2014; 25:1161–1176.

Mokhamer, E.H.M., Zidan, A.A.A., El.Ghayesh, N.K. *et al*. Attenuation of trichloroacetic acid-induced hepatocellular carcinoma by *Artemisia judaica* ethanolic extract in male rats. *JoBAZ* **83**, 2 (2022). <https://doi.org/10.1186/s41936-022-00264-z>

Montllor-Albalade C, Kim H, Thompson AE, Jonke AP, Torres MP, Reddi AR. Sod1 integrates oxygen availability to redox regulate NADPH production and the thiol redoxome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(1):e2023328119. doi: 10.1073/pnas.2023328119. PMID: 34969852; PMCID: PMC8740578.

Morris, E.M., Scott, R., Thyfault, J.P., and Ibdahl, J.A. Mitochondria and redox signaling in steatohepatitis. *Antioxid. Redox Signal*. 2011;15(2): 485–504. doi:10.1089/ars.2010.3795. PMID:21128703.

Mughal MJ, Xi P, Yi Z, Jing F. Aflatoxin B1 invokes apoptosis via death receptor pathway in hepatocytes. *Oncotarget*. 2017;8(5):8239-8249. doi: 10.18632/oncotarget.14158. PMID: 28030812; PMCID: PMC5352397.

Nuno SP, Colaço A, Gil da Costa RM, Oliveira MM, Peixoto F, Oliveira AP. N-diethylnitrosamine mouse hepatotoxicity: time-related effects on histology and oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol*. 2014;66(9-10):429-436. doi:10.1016/j.etp.2014.07.002

Nishida N, Kudo M. Recent advancements in comprehensive genetic analyses for human hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 2013;84:93-7.

Niture SK, Velu CS, Smith QR, Bhat GJ, Srivenugopal KS. Increased expression of the MGMT repair protein mediated by cysteine prodrugs and chemopreventative natural products in human lymphocytes and tumor cell lines. *Carcinogenesis*. 2007 Feb;28(2):378-89. doi: 10.1093/carcin/bgl155. Epub 2006 Aug 31. PMID: 16950796.

Palmeira SM, Silva PR, Ferrão JS, Ladd AA, Dagi ML, Grisolia CK, HernandezBlazquez FJ. Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Eur J Cancer Prev*. 2016; 25(4):299-305.

Pang Y, Li W, Ma R, Ji W, Wang Q, Li D, Xiao Y, Wei Q, Lai Y, Yang P, Chen L, Tang S, Lin Y, Zhuang Z, Zheng Y, Chen W. Development of human cell models for assessing the carcinogenic potential of chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008;232:478–486.

Ramos MIS, Umaki MCS, Hiane PI, Filho MMR. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitamínicos “A” da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) B.CEPPA. 2001. v. 19, n. 1, p. 2332.

Rafacho BPM, Stice CP, Liu C, Greenberg AS, Ausman LM, Xiang-Dong Wang. Inhibition of diethylnitrosamine-initiated alcohol-promoted hepatic inflammation and precancerous lesions by flavonoid luteolin is associated with increased sirtuin 1 activity in mice. *HepatoBiliary Surg Nutr.* 2015; 4(2):124-134.

Ricchi, M. , Odoardi, M. R., Carulli, L. , Anzivino, C. , Ballestri, S. , Pinetti, A. , Fantoni, L. I., Marra, F. , Bertolotti, M. , Banni, S. , Lonardo, A. , Carulli, N. and Loria, P. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2009;24: 830-840. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x

Roll MM, Miranda-Vilela AL, Longo JPF, Agostini-Costa TDS, Grisolia CK. The pequi pulp oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. *Genet Mol Biol.* 2018;41(4):858-869. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2017-0218. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30507999; PMCID: PMC6415600.

Rodriguez-Amaya DB (1997). Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Arlington: John Snow Incorporated/OMNI Project.

Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA. Catalase and its mysteries. *Prog Biophys Mol Biol.* 2018;140:5-12. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29530789.

Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, Valentine JS. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem Rev.* 2014;114(7):3854-918. doi: 10.1021/cr4005296. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24684599; PMCID: PMC4317059.

Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:715-748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28441057.

Singh KB, Maurya BK, Trigun SK. Activation of oxidative stress and inflammatory factors could account for histopathological progression of aflatoxin-B1 induced hepatocarcinogenesis in rat. *Mol. Cell. Biochem.* 2015; 401, 185–196.

Siriwardhana N, Choudhary S, Wang HC. Precancerous model of human breast epithelial cells induced by NNK for prevention. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 109(3):427-41.

Steward WP, Brown K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *Br J Cancer.* 2013;109(1):1-7. doi: 10.1038/bjc.2013.280. Epub 2013 Jun 4. PMID: 23736035; PMCID: PMC3708589.

Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal, A, Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality

worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71: 209- 249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Tadesse S, Anshabo AT, Portman N, Lim E, Tilley W, Caldon CE, Wang S. Targeting CDK2 in cancer: challenges and opportunities for therapy. *Drug Discov Today.* 2020;25(2):406-413. doi: 10.1016/j.drudis.2019.12.001. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31839441.

Takaki A, Yamamoto K. Control of oxidative stress in hepatocellular carcinoma: Helpful or harmful? *World J Hepatol.* 2015; 7(7): 968-979.

Takaki, A., Kawai, D., and Yamamoto, K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(10): 20704–20728. doi:10.3390/ijms141020704. PMID:24132155.

Ting CT, Li WC, Chen CY, Tsai TH. Preventive and therapeutic role of traditional Chinese herbal medicine in hepatocellular carcinoma. *Journal of the Chinese Medical Association.* 2015; 78:139-144.

Tsang, C., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., Zheng XF. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat Commun.* 2014; 5, 3446. <https://doi.org/10.1038/ncomms4446>

Vinken M, Doktorova T, Ellinger-Ziegelbauer H, Ahr HJ, Lock E, Carmichael P, Roggen E, van Delft J, Kleinjans J, Castell J, Bort R, Donato T, Ryan M, Corvi R, Keun H, Ebbels T, Athersuch T, Sansone SA, Rocca-Serra P, Stierum R, Jennings P, Pfaller W, Gmuender H, Vanhaecke T, Rogiers V. The carcinoGENOMICS project: critical selection of model compounds for the development of omics-based in vitro carcinogenicity screening assays. *Mutat Res.* 2008; 659(3):202-10.

Wang Y, Qiu Z, Zhou B, Liu C, Ruan J, Yan Q, Liao J, Zhu F. In vitro antiproliferative and antioxidant effects of urolithin A, the colonic metabolite of ellagic acid, on hepatocellular carcinomas HepG2 cells. *Toxicology in vitro.* 2015; 29:1107-1115.

World Health Organization (WHO). Estimated number of new cases from 2020 to 2040, Both sexes, age. WHO; 2020. Acessado em junho de 2022. https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=0&sexes=0&mode=population&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=0&cancers=39&populations=903_904_905_908_909_935.

World Health Organization (WHO). Cancer. Acessado em jun de 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

Yang HY, Lee TH. Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. *BMB Rep.* 2015; 48(4): 200-208.

Yilmaz, S., Kaya, E., Kisacam, M. A. The Effect on Oxidative Stress of Aflatoxin and Protective Effect of Lycopene on Aflatoxin Damage. In: Abdulra'uf, L. B., editor. *Aflatoxin - Control, Analysis, Detection and Health Risks* [Internet]. London: IntechOpen; 2017 [cited 2022 Jul 07]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/55562> doi: 10.5772/intechopen.69321.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(3):337-49. doi: 10.1016/s0891-5849(02)00905-x. PMID: 12126755.

Zhang, B., Dai, Y., Zhu, L. et al. Single-cell sequencing reveals novel mechanisms of Aflatoxin B1-induced hepatotoxicity in S phase-arrested L02 cells. *Cell Biol Toxicol.* 2020; 36:603–608. <https://doi-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10565-020-09547-z>.

Zhang J, Gan Y, Li H, Yin J, He X, Lin L, Xu S, Fang Z, Kim BW, Gao L, Ding L, Zhang E, Ma X, Li J, Li L, Xu Y, Horne D, Xu R, Yu H, Gu Y, Huang W. Inhibition of the CDK2 and Cyclin A complex leads to autophagic degradation of CDK2 in cancer cells. *Nat Commun.* 2022;13(1):2835. doi: 10.1038/s41467-022-30264-0. PMID: 35595767; PMCID: PMC9122913.

Zheng K, Cubero FJ, Nevzorova YA. c-MYC—Making Liver Sick: Role of c-MYC in Hepatic Cell Function, Homeostasis and Disease. *Genes.* 2017; 8, 123.

Zheng Q, Qiu Z, Liu X, Zhang L, Caib S, Zhang X. Antiproliferative effect of *Dendrobium catenatum* Lindley polypeptides against human liver, gastric and breast cancer cell lines. *Food & Function (Food & Func.).* 2015. doi: 10.1039/c5fo00060b

Zhou L, Wen J, Huang Z, Nice EC, Huang C, Zhang H, Li Q. Redox proteomics screening cellular factors associated with oxidative stress in hepatocarcinogenesis. *Proteomics Clin Appl.* 2017;11(3-4). doi: 10.1002/prca.201600089. Epub 2016 Dec 2. PMID: 27763721.

Zhou Y, Wang S, Luo H, Xu F, Liang J, Ma C, Ren L, Wang H, Hou Y. Aflatoxin B1 induces microglia cells apoptosis mediated by oxidative stress through NF- κ B signaling pathway in mice spinal cords. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2022;90:103794. doi: 10.1016/j.etap.2021.103794. Epub 2021 Dec 29. PMID: 34971797.