

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

Potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados obtidos pela
interesterificação da tributirina com a tricaprilina na hepatocarcinogênese
experimental

Juliana Marques Affonso

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

São Paulo
2022

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

Potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados obtidos pela
interesterificação da tributirina com a tricaprilina na hepatocarcinogênese
experimental

Juliana Marques Affonso

Versão Original

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

São Paulo
2022

JULIANA MARQUES AFFONSO

Potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados obtidos pela interesterificação da tributirina com a tricaprilina na hepatocarcinogênese experimental

Comissão Julgadora
da tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Tit. Dr. Fernando Salvador Moreno
Orientador/Presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2022.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

A257p Affonso, Juliana Marques
Potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados obtidos pela interesterificação da tributirina com a tricaprilina na hepatocarcinogênese experimental / Juliana Marques Affonso. - São Paulo, 2022.
99 p.

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

1. Carcinoma hepatocelular. 2. Quimioprevenção. 3. Biotecnologia. 4. Lipídios estruturados. 5. Tributirina. I. T. II. Moreno, Fernando Salvador, orientador.

RESUMO

AFFONSO, J.M. **Potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados obtidos pela interesterificação da tributirina com a tricaprilina na hepatocarcinogênese experimental.** 2022. 99f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A quimioprevenção do carcinoma hepatocelular (HCC) tem sido um campo de grande interesse devido aos tratamentos insuficientes e ao mau prognóstico da doença. O ácido butírico (AB), é um agente anticarcinogênico promissor em estudos de carcinogênese experimental. Entretanto, seu perfil farmacocinético desfavorável limita sua aplicação clínica. O ácido caprílico (AC) pode ser utilizado em formulações farmacêuticas para aumentar a absorção de outros compostos por via paracelular. Nesse sentido, um sistema de aporte de fármaco baseado em lipídios estruturados (EST) carreadores de AB pode consistir em uma potencial estratégia quimiopreventiva do HCC. Assim, este estudo tem como objetivo a produção de EST a partir de triacilgliceróis como a tributirina (TB), pró-fármaco do AB, e a tricaprilina (TC), fonte de AC, e a avaliação da sua atividade quimiopreventiva quando administrados continuamente durante as fases de iniciação e promoção inicial da hepatocarcinogênese. Os EST foram produzidos pela interesterificação enzimática de uma mistura TB/TC. Ratos Fischer-344 foram submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com controle isocalórico de maltodextrina (MD), TB, TC ou EST antes e durante o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas (LPN). Em comparação com o controle MD, o tratamento com EST reduziu ($p<0,05$) o número de nódulos macroscópicose e o número de pLPN. Os grupos tratados com TB, TC e EST apresentaram menores ($p<0,05$) índices de proliferação celular em comparação ao controle MD, e o grupo tratado com EST apresentou, ainda, menores índices de crescimento ajustado ($p<0,05$). Os animais tratados com TC, TB e EST apresentaram maiores ($p<0,05$) concentrações de AB por grama de tecido hepático em relação ao grupo MD. Por outro lado, ratos tratados com TC e EST apresentaram maiores ($p<0,05$) concentrações de AC por grama de tecido hepático em relação ao controle MD. Os animais dos grupos TB, TC e EST apresentaram cometas de comprimentos menores ($p<0,05$), quando comparados aos animais do grupo controle MD. Além disso, os grupos tratados com TB e EST apresentaram menores níveis de γ H2AX ($p<0,05$) em relação ao grupo controle MD. O sequenciamento do RNA e as análises de bioinformática apontaram para modulação de vias relacionadas às espécies reativas de oxigênio e NRF2. As análises *in vitro* com células THLE5B (hepatócitos imortalizados) e Huh7 (células de HCC humano) confirmaram a atividade antioxidante dos EST. Assim, os resultados sugerem que a atividade quimiopreventiva dos EST está relacionada modulação das vias relacionadas ao metabolismo das espécies reativas de oxigênio e do NRF2 em ratos Fischer-344 tratados durante as fases de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese. **Palavras chave:** Carcinoma hepatocelular, quimioprevenção, biotecnologia, lipídios estruturados, tributirina, tricaprilina.

ABSTRACT

AFFONSO, J.M. **Chemopreventive potential of structured lipids obtained by interesterification of tributyrin and tricaprylin in experimental hepatocarcinogenesis.** 2022. 99f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Chemoprevention of hepatocellular carcinoma (HCC) has been a field of great interest due to insufficient treatments and poor prognosis of the disease. Butyric acid (AB) is a promising anticarcinogenic agent in experimental carcinogenesis studies. However, its unfavorable pharmacokinetic profile limits its clinical application. Caprylic acid (CA) can be used in pharmaceutical formulations to increase the absorption of other compounds via the paracellular pathway. In this sense, a drug delivery system based on structured lipids (EST) carriers of AB may be a potential chemopreventive strategy for HCC. Thus, this study aims to produce EST from triacylglycerols such as tributyrin (TB), a prodrug of AB, and tricaprillin (TC), a source of AC, and to evaluate their chemopreventive activity when administered continuously during the initiation and initial promotion phases of hepatocarcinogenesis. ESTs were produced by enzymatic interesterification of a TB/TC mixture. Fischer-344 rats were submitted to the resistant hepatocyte model and treated with an isocaloric control of maltodextrin (MD), TB, TC or EST before and during the development of preneoplastic lesions (PNL). Compared with the MD control, EST treatment reduced ($p < 0.05$) the number of macroscopic nodules and the number of pPNL. Groups treated with TB, TC and EST showed lower ($p < 0.05$) rates of cell proliferation compared to the MD control, and the group treated with EST also showed lower rates of adjusted growth ($p < 0.05$). The animals treated with TC, TB and EST had higher ($p < 0.05$) AB concentrations per gram of liver tissue compared to the MD group. On the other hand, rats treated with TC and EST had higher ($p < 0.05$) concentrations of AC per gram of liver tissue compared to the MD control. The animals of the TB, TC and EST groups presented comets with smaller lengths ($p < 0.05$), when compared to the animals of the MD control group. In addition, the groups treated with TB and EST showed lower levels of γ H2AX ($p < 0.05$) when compared to the MD control group. RNA sequencing and bioinformatics analyzes pointed to modulation in pathways related to reactive oxygen species and NRF2. *In vitro* analyzes with THLE5B (immortalized hepatocytes) and Huh7 (human HCC cells) cells confirmed the antioxidant activity of EST. Thus, the results suggest that the chemopreventive activity of ESTs are related to the modulation of pathways related to the metabolism of reactive oxygen species and NRF2 in Fischer-344 rats treated during the initiation and promotion phases of hepatocarcinogenesis. **Keywords:** Hepatocellular carcinoma, chemoprevention, biotechnology, structured lipids, tributyrin, tricaprylin.

लोकः समस्ताः सुखिनो भवन्तु

“Lokah Samastah Sukhino Bhavantu”

“May all beings everywhere be happy and free, and may the thoughts, words, and actions of my own life contribute in some way to that happiness and to that freedom for all.”

(Sanskrit mantra)

*Ao meu pai Milton e minha mãe Christiane,
que construíram em mim uma base sólida de
amor e me deram oportunidades para que eu
 siga tomando decisões de maneira livre e
segura.*

Agradecimentos

A toda minha família, pelo grande incentivo para que eu chegasse até aqui.

Ao Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno, por acreditar em meu potencial, por me abrir as mais diversas portas, pelas reflexões e pelo exemplo de ser humano. Sua integridade e senso de justiça são admiráveis.

À Thais D'Amico, minha fã, fiel escudeira e melhor amiga. Saiba que quem ganhou uma fiel escudeira para a vida foi você. Obrigada pela sua amizade e pela parceria em absolutamente todos os momentos. Sem você nada disso teria sido possível.

Ao meu melhor amigo, Agus Pudja. Obrigada por existir, me apoiar nas minhas escolhas e me ouvir sempre. Minha vida sem você não seria a mesma.

Ao Técnico do Laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer, Renato Heidor, e à futura Dra., Jossana Ruff, por toda a ajuda e discussões enriquecedoras.

A todos os funcionários do Biotério IQ/FCF – USP pelo cuidado com os animais e aos Professores Juliana Ract e Eduardo Purgato pelas análises realizadas.

Ao Prof. Jens Marquardt, por acompanhar este projeto desde o início e pela oportunidade de trabalhar com seu grupo de pesquisa na Universität zu Lübeck. Agradeço pela recepção, cuidado e reconhecimento.

Aos meus amigos de Lübeck, Antonella, Darko, Jovana e Monika. Obrigada pelo acolhimento desde meu primeiro dia na Alemanha, por toda a ajuda e amizade.

Ao Francesco Arioli, meu maior presente. Obrigada por dividir a vida comigo, por acreditar em nós e pelos meus melhores momentos nos dois lados do oceano.

Às agências de fomento científico, pelos auxílios concedidos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Projeto nº 2017/22495-2; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo nº 141171/2018-9; O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.570763/2020-00.

Lista de abreviaturas

2-AAF	2-acetilaminofluoreno
AB	Ácido butírico
AC	Ácido caprílico
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
ANOVA	Análise de variância
CBA _s	Compostos bioativos dos alimentos
CSC	do inglês, <i>Cancer Stem Cells</i>
DCF	Clormetil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato, CM-H2DCF-DA
DDR	Vias de resposta ao dano no DNA
DEN	Dietilnitrosamina
DNMT	DNA metiltransferase
DSBs	Quebras de fita dupla do DNA
ES	do inglês, <i>Enrichment Score</i>
EST	Lipídios estruturados
F-344	Fischer-344
FDR	Taxa de falsa descoberta
GSEA	do inglês, <i>gene set enrichment analysis</i>
GST-P	Glutationa-S-transferase na forma placentária
HAT	Acetiltransferase de histona
HBV	Vírus da hepatite B
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCV	Vírus da hepatite C
HDAC	Desacetilase de histona

Hif-1 α	Fator induzível por hipóxia 1 α
ICA	Índice de Crescimento Ajustado
IPA	do inglês, <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> ®
LPN	Lesões pré-neoplásicas
MD	Maltodextrina
miRNAs	MicroRNAs
NaBu	Butirato de sódio
NaCa	Caprilato de sódio
NI	Não iniciado
NRF2	Fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide 2
pLPN	Lesões pré-neoplásicas persistentes
PCA	Análise de componentes principais
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
RH	Hepatócito resistente
rLPN	Lesões pré-neoplásicas em remodelação
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
SP	do inglês, <i>Side population</i>
TB	Tributirina
TC	Tricaprilina
TJ	do inglês, <i>Tight junctions</i>
THLE5B	do inglês, <i>Transformed human liver epithelial-5B</i>
TUNEL	do inglês, <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de Tabelas

Tabela 1. Peso corporal inicial e final, bem como peso hepático relativo, incidência de nódulos e seu número médio dos animais submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção da hepatocarcinogênese.

Tabela 2. Análise morfométrica pela marcação com GST-P, demonstrando número de lesões preneoplásicas persistentes (pLPN) e em remodelação (rLPN) por cm^2 , tamanho médio das mesmas (mm^2) e porcentagem da área dos cortes hepáticos ocupados por pLPN e rLPN em animais submetidos ao modelo do RH e tratados continuamente com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Tabela 3. Avaliação do índice de proliferação (porcentagem de núcleos marcados com PCNA) em lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Tabela 4. Avaliação do índice apoptótico (porcentagem de corpúsculos apoptóticos), em lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Tabela 5. Avaliação do índice de crescimento ajustado (razão índice de proliferação / índice apoptótico), em lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Lista de Figuras

Figura 1. Perfil de metilação de DNA no câncer.

Figura 2. Imagem representativa de nódulos macroscópicos, lesão preneoplásica persistente (pLPN) e lesão preneoplásica em remodelação (rLPN) em fígado de rato submetido ao modelo do hepatócito resistente.

Figura 3. Representação esquemática de quatro vias de absorção intestinal: via paracelular, transcitose, mediada por transportador e difusão transcelular Adaptado de Kosińska e colaboradores, 2013 (KOSIŃSKA; ANDLAUER, 2013).

Figura 4. Representação esquemática da interesterificação enzimática da tributirina com a tricaprilina pela ação da lipase 1,3 específica, dando origem a lipídios estruturados.

Figura 5. Desenho experimental. Modelo do hepatócito resistente.

Figura 6. Cromatogramas representativos da composição em triacilgliceróis da tributirina (i), tricaprilina (ii) e lipídios estruturados (iii). B=4:0 – ácido butírico e C=8:0 – ácido caprílico.

Figura 7. Evolução do peso corporal dos animais do grupo não iniciado, bem como dos submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente e tratados com maltodextrina, tributirina, tricaprilina ou lipídios estruturados durante as 8 semanas de experimento.

Figura 8. Imagem representativa do aspecto macroscópico dos fígados dos animais do grupo não iniciado (NI), bem como dos submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Figura 9. Avaliação do índice de proliferação (porcentagem de núcleos marcados com PCNA), em lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Figura 10. Avaliação do índice apoptótico (porcentagem de corpúsculos apoptóticos), em lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Figura 11. Concentrações hepáticas de ácido butírico (AB) (i) e ácido caprílico (AC) (ii) do tecido hepático de ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tricaprilina (TC), tributirina (TB) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Figura 12. Avaliação do dano no DNA. (i) Média do comprimento dos cometas em μm dos fígados dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Figura 13. Mapa de calor, ou *Heatmap*, ilustrando as diferenças globais na expressão gênica entre ratos (i) não submetidos ao modelo do RH (norm) e animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tricaprilina (TC), tributirina (TB) ou lipídios estruturados (EST); (ii) animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST). As cores indicam genes com aumento (vermelho) ou redução (azul) da expressão. Foram analisadas amostras de RNA de 3 animais por grupo experimental. $P < 0,05$.

Figura 14. Análise de componentes principais que ilustra a compartimentalização entre os grupos de animais tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) e submetidos ao modelo do RH.

Figura 15. Identificação de vias canônicas. Os genes diferencialmente expressos foram categorizados em vias canônicas pelo software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). O Z-score indica se esta via de sinalização específica está ativada ou inibida. As vias ativadas têm pontuação positiva e estão coradas em laranja, enquanto as vias inibidas têm pontuação negativa e estão apresentadas em azul. A cor cinza indica que a função não pôde ser prevista.

Figura 16. Análise de enriquecimento de conjuntos de genes obtida por GSEA evidenciando enriquecimento para **(i)** o gene NRF2 e **(ii)** para a via das espécies reativas de oxigênio no grupo EST quando comparado ao grupo MD.

Figura 17. Valores médios de IC50 obtidos para o tratamento de células **(A)** THLE5B (hepatócitos humanos imortalizados) tratadas com butirato de sódio (NaBu); **(B)** Huh7 (células de carcinoma hepatocelular humano) tratadas com NaBu; **(C)** THLE5B tratadas com caprilato de sódio (NaCa); **(D)** Huh7 tratadas com NaCa a partir de três experimentos independentes. Dados expressos na forma de Média \pm SD.

Figura 18. Atividades antioxidantes. Alterações no status redox foram avaliadas usando o indicador ROS CM-H2DCF-DA em células THLE5B **(A)** e Huh7 **(B)** não tratadas (NT) e após 72h de exposição a butirato de sódio (NaBu), caprilato de sódio (NaCa) ou combinação NaBu + NaCa mimetizando os lipídios estruturados (EST). Os dados representam *fold change* de intensidade de fluorescência em relação ao grupo não tratado de três experimentos independentes (Média \pm SD).

Lista de Anexos

Anexo 1. Imagens microscópicas representativas de cortes histológicos de fígado.

Anexo 2. Esquema representativo das interações do fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide 2 (NRF2) e suas vias metabólicas.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Câncer de Fígado: epidemiologia e fatores de risco	19
1.2 Hepatocarcinogênese	20
1.2.1 Eventos genéticos	22
1.2.1.1 Instabilidade genômica	22
1.2.1.2 Polimorfismos de nucleotídeo único	22
1.2.1.3 Mutações somáticas	23
1.2.2 Eventos epigenéticos	26
1.2.2.1 Metilação do DNA	27
1.2.2.2 Modificações em histonas	29
1.2.2.3 microRNAs	30
1.2.3 Vias de resposta ao dano no DNA no HCC	32
1.2.4 O modelo <i>Cancer Stem Cell</i> de desenvolvimento do HCC	33
1.3 Modelo de hepatocarcinogênese experimental: Hepatócito Resistente	34
1.4 Alimentação e carcinogênese	36
1.5 Quimioprevenção do câncer com compostos bioativos dos alimentos	37
1.6 Tributirina.....	38
1.7 Tricaprilina	39
1.7.1 Tight junctions	40
1.8 Lipídios estruturados	42
1.8.1 Formas de produção de EST	42
1.8.1.1 Interesterificação química	42
1.8.1.2 Interesterificação enzimática	43
1.8.2 EST no contexto da quimioprevenção	43
2. OBJETIVO	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Preparo dos EST	45
3.2 Composição de triacilgliceróis dos EST	45
3.3 Ensaio in vivo	46

3.3.1 Modelo de hepatocarcinogênese do hepatócito resistente (RH).....	46
3.3.2 Protocolo Experimental	46
3.3.3 Eutanásia dos animais.....	48
3.3.4 Exame macroscópico do fígado.....	48
3.4 Análise morfométrica e da proliferação celular	49
3.5 Avaliação da apoptose	50
3.6 Avaliação do índice de crescimento ajustado.....	50
3.7 Determinação das concentrações hepáticas de ácido butírico e caprílico	51
3.8 Cometa neutro	51
3.9 Western blot.....	52
3.10 Sequenciamento do RNA e análises de bioinformática	53
3.11 Ensaios <i>in vitro</i>	54
3.11.1 Determinação do IC50.....	54
3.11.2 Status redox celular	55
3.12 Análises estatísticas	55
4. RESULTADOS	56
4.1 Caracterização dos EST	56
4.2 Ensaio biológico	58
4.2.1 Modelo do RH – evolução do peso corporal	58
4.2.2 Exame macroscópico do fígado.....	60
4.3 Análise morfométrica: avaliação de pLPN e rLPN GST-P positivas.....	61
4.4 Avaliação da proliferação celular	63
4.5 Avaliação da apoptose.....	64
4.6 Avaliação do índice de crescimento ajustado.....	66
4.7 Determinação das concentrações hepáticas de ácido butírico e caprílico	67
4.8 Avaliação do dano no DNA	68
4.9 Sequenciamento do RNA	70
4.9.1 Identificação de vias canônicas e análise de enriquecimento GSEA	72
4.10 Ensaios <i>in vitro</i>	76
4.10.1 Determinação do IC50.....	76
4.10.2 Status redox celular	78

5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÃO.....	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
8. ANEXOS	98

1 Introdução

1.1 Câncer de Fígado: epidemiologia e fatores de risco

O câncer de fígado é a sexta neoplasia mais incidente e a terceira causa mais frequente de morte relacionada ao câncer em todo o mundo, com aproximadamente 906 mil novos casos e 830 mil mortes anualmente (SUNG et al., 2021). Em 23 países o câncer de fígado é a principal causa de morte por câncer. O número de casos e de mortes relacionado a esse câncer é de duas a três vezes maior em homens do que em mulheres, sendo a segunda causa de morte por neoplasias do sexo masculino no mundo (SUNG et al., 2021). Entre os tipos de câncer de fígado primários mais comuns estão o carcinoma hepatocelular (HCC), que consiste em 75 – 85% dos casos, e o colangiocarcinoma intra-hepático, que corresponde a 10 a 15% dos diagnósticos (LLOVET et al., 2016). A ocorrência do HCC resulta de uma interação complexa entre fatores genéticos e epigenéticos do indivíduo, exposição a carcinógenos e vírus ambientais, e desenvolvimento de determinada doença hepática crônica, que, em seu estágio final, torna-se um campo pró-carcinogênico (ZUCMAN-ROSSI et al., 2015). Mais de 80% dos HCCs desenvolvem-se em fígados com cirrose após exposição a fatores de risco específicos, representados principalmente por infecções virais de hepatite B (HBV) e C (HCV), consumo de bebidas alcoólicas, obesidade, esteato-hepatite não alcoólica, ingestão de alimentos contaminados pelo metabólito fúngico aflatoxina B1 e doenças genéticas raras (NAULT et al., 2013). Em comparação com outras causas de cirrose, a infecção crônica pelo vírus da hepatite B ou C está associada a um maior risco de desenvolvimento de HCC (PERZ et al., 2006). O etilismo representa uma das principais causas de cirrose e é também um dos principais contribuintes para a elevada incidência de HCC em muitas partes do mundo.

Os principais fatores de risco para o HCC variam de acordo com a região geográfica. Em locais que apresentam incidência elevada para o desenvolvimento do HCC, como a China e países da África Oriental, os principais agentes etiológicos incluem a infecção por HBV e a exposição a alimentos contaminados por aflatoxinas. Em outras regiões, como o Japão e o Egito, a infecção por HCV é a principal causa para o desenvolvimento do HCC. O país que apresenta a maior incidência e mortalidade pelo HCC é a Mongólia, onde os fatores etiológicos para a doença são as

infecções por HBV e HCV e o consumo de bebidas alcóolicas (BRAY et al., 2018). A obesidade, diabetes e a doença hepática gordurosa não alcóolica são fatores que contribuem para o aumento do número de casos de HCC em regiões desenvolvidas que apresentavam tradicionalmente número de casos reduzidos da doença, como América do Norte e Europa (FUJIWARA et al., 2018; KULIK, EL-SERAG, 2019; SUNG et al., 2021).

1.2 Hepatocarcinogênese

A hepatocarcinogênese compreende o lento e contínuo processo de desenvolvimento do HCC, que a partir de alterações genéticas e epigenéticas, leva um ou vários hepatócitos à aquisição de um fenótipo neoplásico com capacidade de crescer de forma autônoma e, em última instância, metastizar para locais fora e distantes do fígado (COLEMAN, 2005).

É bem estabelecido que se trata de um processo de múltiplas etapas, que podem ser classificadas basicamente em iniciação, promoção e progressão, porém os eventos moleculares precisos relacionados à hepatocarcinogênese permanecem apenas parcialmente compreendidos (ZUCMAN-ROSSI et al., 2015). Na última década, o estudo do câncer passou de uma avaliação de variantes de genes e vias individuais para uma série de análises de padrões de expressão gênica e perfis epigenéticos de células e tecidos tumorais (DHANASEKARAN et al., 2019).

Alterações genéticas e epigenéticas que se acumulam progressivamente em um contexto de aumento de espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias e fibrose, provavelmente, levam ao início do HCC. Tanto a iniciação quanto as etapas subsequentes são marcadas por várias marcas registradas (do inglês, *hallmarks*), que incluem proliferação celular sustentada, evasão de supressores de crescimento, imortalidade replicativa, ativação da invasão e metástase, indução da angiogênese e resistência à morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LIU; JIANG; GUAN, 2014).

Mutações em genes envolvidos na regulação de importantes sistemas celulares, fixadas após um ciclo proliferativo da célula, caracterizam a fase de iniciação. Alguns dos clones celulares iniciados são selecionados e proliferam durante

o estágio de promoção da hepatocarcinogênese (CALVISI et al., 2004) originando uma pré-neoplasia. Esta é, geralmente, constituída por foci de hepatócitos com expressão enzimática alterada e nódulos displásicos (KOJIRO; ROSKAMS, 2005).

Agentes promotores estão envolvidos na proliferação e resistência à apoptose dos clones iniciados (COLUMBANO et al., 2005). Esses agentes podem ser fatores que induzem a citotoxicidade crônica, inflamação e estímulo regenerativo como ocorre, por exemplo, na hepatite alcóolica (LIEBER et al., 2004). Uma vez que a promoção é uma fase que apresenta como característica a reversibilidade, é necessária a exposição constante ao agente promotor para que a pré-neoplasia progrida (PITOT, 2001). Em contraste com os dois primeiros estágios do desenvolvimento neoplásico, que são ocultos (iniciação) ou reversíveis (promoção), a progressão, uma vez estabelecida por uma transição irreversível do estágio de promoção, é caracterizada pelo estabelecimento da malignidade da neoplasia devido a mutação em centenas ou milhares de genes (PITOT, 2001).

A heterogeneidade do HCC, caracterizada por alterações moleculares distintas em diferentes subclones no interior de cada neoplasia ou entre neoplasias de diferentes pacientes, contribui para a resistência aos medicamentos utilizados em terapias sistêmicas aprovadas para o tratamento de HCC irressecável (CARUSO et al., 2020). Assim, a compreensão genética e molecular da doença, por meio de técnicas de sequenciamento de nova geração, tem se mostrado uma estratégia importante e necessária (TOH; LIM; CHOW, 2019).

Análises integradas de múltiplas plataformas de dados com abrangência genômica/epigenômica, em conjunto com dados clínicos, facilitam a identificação de alvos terapêuticos e a caracterização de subclasses de HCC bem definidas com implicações prognósticas que podem influenciar o gerenciamento clínico da doença (ALLY et al., 2017). A identificação de alterações genômicas em genes *drivers*, aqueles que estão diretamente relacionados ao câncer, constitui uma importante estratégia para o estabelecimento de biomarcadores que podem ser utilizados em abordagens terapêuticas específicas. Durante o desenvolvimento da neoplasia, também ocorrem mutações em genes *passengers*, porém estas não possuem efeito direto nem indireto na carcinogênese (VOGELSTEIN et al., 2013).

Os eventos que contribuem para a iniciação e evolução do HCC podem ser classificadas em genéticos, que incluem instabilidade genômica, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e mutações somáticas (NIU; NIU; WANG, 2016); e epigenéticos, relacionados a mudanças na metilação, remodelação da cromatina, microRNAs e RNAs longos não codificantes (DHANASEKARAN et al., 2019), conforme veremos a seguir.

1.2.1 Eventos genéticos

1.2.1.1 Instabilidade genômica

A instabilidade genômica é definida como uma alta frequência de mutações dentro do genoma, incluindo mudanças nas sequências de ácido nucleico, rearranjos cromossômicos ou aneuploidia, que levam a um aumento nas alterações genéticas, possibilitando, assim, a aquisição de recursos adicionais necessários para o desenvolvimento da neoplasia (PIKOR et al., 2013).

Embora ainda haja um debate se a instabilidade genômica é uma causa ou consequência da carcinogênese, ela está presente em quase todos os tipos e estágios de cânceres humanos e afeta o prognóstico e as respostas ao tratamento de pacientes com a doença (VINCENT et al., 2014). A instabilidade genômica pode se dar na forma de instabilidade cromossômica, instabilidade de microssatélites (acúmulo de mutações em sequências repetitivas de DNA que compõem algumas regiões do genoma) ou níveis significativamente elevados de mutações nucleotídicas (NIU; NIU; WANG, 2016).

1.2.1.2 Polimorfismos de nucleotídeo único

O entendimento da complexidade do HCC tem aumentado e delineado um panorama molecular que inclui não só alterações genéticas recorrentes que impulsionam a expansão da neoplasia, como também variantes herdadas que aumentam o risco de HCC (CARUSO et al., 2020). Evidências demonstraram suscetibilidade multifatorial ao HCC envolvendo fatores genéticos e ambientais. Vários polimorfismos de nucleotídeo único foram associados ao risco de HCC. SNP são a forma mais comum de polimorfismos genéticos humanos que podem contribuir

para a suscetibilidade e progressão de um indivíduo para o câncer (NIU; NIU; WANG, 2016). O acúmulo de evidências sugere uma associação entre SNP em certos genes e suscetibilidade ao HCC, incluindo predisposição a fatores de risco, gravidade da doença hepática, transformação maligna e progressão tumoral (CARUSO et al., 2020). Estudos de associação ampla do genoma surgiram como uma nova abordagem para identificar alelos de susceptibilidade ao câncer menos penetrantes que podem estar associados ao início e progressão do câncer; porém, em conjunto, os resultados disponíveis mostram que a maioria das descobertas relacionadas aos SNP detectados por esses estudos no HCC pode ser problemática para replicar devido a diferenças entre grupos raciais/étnicos, desenhos de estudo e heterogeneidade genética (NIU; NIU; WANG, 2016).

1.2.1.3 Mutações somáticas

Mutações somáticas ocorrem em células somáticas (não germinativas) e, portanto, não são herdáveis. Quando essas mutações ocorrem em proto-oncogenes, genes supressores de tumor, ou em genes envolvidos em vias reguladoras, elas podem levar à transformação celular e à tumorigênese (DHANASEKARAN et al., 2019).

Expressões anormais de genes estimuladores da proliferação celular, que incluem proto-oncogenes, como *MYC*, *RAS* e *RAF*, conferem à célula vantagens de crescimento e desenvolvimento em relação às células normais. Por outro lado, genes supressores de tumor como *TP53* modulam a progressão do ciclo celular, mantendo a célula em latência, ou induzindo sua morte, caso as condições de progressão do ciclo celular não sejam favoráveis (THORGEIRSSON; GRISHAM, 2002). Os genes supressores de tumor estão envolvidos na inibição da expressão do fenótipo maligno, podendo ser inativados por mutações durante o processo da carcinogênese. Assim, uma mutação que iniba esses genes poderá resultar na perda de mecanismos naturais de controle da proliferação, tendo por consequência a multiplicação excessiva das células (MARTIN; DUFOUR, 2008).

Estudos de sequenciamento de nova geração e de sequenciamento de exoma completo permitiram a identificação de genes *drivers* do HCC (NIU; NIU; WANG, 2016). Além de confirmar a alta frequência de mutações somáticas no gene relacionado à proteína tumoral p53 (*TP53*), beta catenina 1 (*CTNNB1*), *AXIN1* e

TERT, esses estudos identificaram várias novas mutações, como as que ocorrem em genes relacionados à remodelação da cromatina (*ARID1A* e *ARID2*), estresse oxidativo (*NFE2L2*), sinalização RAS/MAPK e muitos outros genes mutados em menor frequência (CARUSO et al., 2020). Com exceção de *ARID1A*, a maioria desses genes *drivers* recentemente identificados sofre mutação em menos de 10% dos casos de HCC (NIU; NIU; WANG, 2016), conforme mostrado no **Quadro 1**. Mutações em genes *drivers* impactam principalmente seis vias biológicas cruciais: manutenção de telômeros, Wnt/ β -catenina, controle do ciclo celular, regulação epigenética, estresse oxidativo e as vias de AKT/mTOR e MAPK (SCHULZE et al., 2015).

Dentre as alterações genéticas observadas no HCC, as mutações do promotor *TERT* foram reconhecidas como as mais precoces e mais frequentes (PEZZUTO et al., 2017), detectadas em 40 a 65% dos casos. Tais mutações culminam na hiperexpressão da telomerase, uma transcriptase reversa necessária para a síntese e manutenção do comprimento dos telômeros e relacionada a imortalização celular.

Em um primeiro momento, o encurtamento telomérico mostra-se crucial na iniciação da hepatocarcinogênese, uma vez que a disfunção dos telômeros desempenha um papel importante na indução da instabilidade cromossômica. No entanto, nem todas as lesões pré-neoplásicas são consideradas capazes de evoluir para o câncer. Somente as células que encontram uma maneira de manter seus telômeros, permitindo a divisão celular ilimitada e algum grau de instabilidade cromossômica, poderão progredir para neoplasias malignas mais avançadas (SATYANARAYANA; MANNS; RUDOLPH, 2004). A reativação da telomerase é, portanto, necessária em uma segunda etapa para garantir o desenvolvimento do HCC, mantendo assim a imortalização do comprimento dos telômeros (KIM et al., 2013). Deste modo, enquanto o encurtamento dos telômeros e a instabilidade cromossômica ocorrem nos estágios iniciais da hepatocarcinogênese, o avanço da neoplasia está associado à manutenção do comprimento dos telômeros por meio da reativação da telomerase (OH et al., 2008). A reativação da telomerase é crucial durante a transformação maligna (TOSHIKUNI et al., 2000; ZUCMAN-ROSSI et al., 2015) e acontece principalmente devido a mutações somáticas no promotor *TERT* (60%), mas também pode ser uma consequência da amplificação de *TERT* (6%), translocação (4%) ou

inserção viral (por HBV ou vírus adeno-associado tipo 2) no promotor (10%) (CRAIG et al., 2020).

Tipo da alteração	Fator envolvido	Função	Resultado da alteração	% HCCs humanos que apresentam a alteração
Genética: mutações somáticas	Promotor TERT	Regulação da atividade da telomerase	Reativação da telomerase, fator chave para a manutenção da estabilidade das células neoplásicas	60% (REBOUISSOU; NAULT, 2020)
	p53 (<i>TP53</i>)	Gene supressor de tumor	Desregulação do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA	48% (REBOUISSOU; NAULT, 2020)
	Wnt/ β -catenin (<i>CTNNB1</i>)	Crucial na embriogênese e controle metabólico do fígado	Ativação de células estreladas hepáticas, fator importante para o processo de fibrose.	35% (REBOUISSOU; NAULT, 2020)
	Wnt/ β -catenin (<i>AXINI</i>)			9% (DING et al., 2017)
	<i>ARID1A</i> e <i>ARID2</i>	Gene supressor de tumor, remodelação da cromatina	Progressão do ciclo celular, proliferação celular, migração, invasão e metástase	17% (REBOUISSOU; NAULT, 2020)
	RAS/MAPK	Transdução de sinal de receptores de superfície celular para o núcleo	Progressão do ciclo celular, proliferação celular	3% (DING et al., 2017)

Quadro 1. Alterações genéticas observadas no HCC e suas frequências.

1.2.2 Eventos epigenéticos

A maioria das mudanças hereditárias é estabelecida durante a diferenciação celular e é mantida de forma estável por vários ciclos de divisão celular, permitindo que as células tenham identidades distintas apesar de conterem a mesma informação genética. A epigenética refere-se ao estudo dessas alterações hereditárias na expressão gênica que ocorrem independentemente das alterações na sequência primária do DNA (SHARMA; KELLY; JONES, 2009), compreendendo uma série de mecanismos reguladores transcricionais, desde os estados de compactação da cromatina, até as modificações covalentes do DNA.

Falhas na manutenção adequada de marcas epigenéticas hereditárias podem resultar na ativação ou inibição de inúmeras vias de sinalização, que podem levar a várias doenças, entre elas, o câncer. A desregulação da expressão gênica, aliada a sinalizações moleculares aberrantes, confere vantagens de sobrevivência às células neoplásicas e são as principais características do câncer (TOH; LIM; CHOW, 2019). Nas últimas décadas, foi demonstrado que padrões indesejáveis nas alterações epigenéticas podem aumentar ainda mais a vantagem seletiva das células neoplásicas (SADIKOVIC et al., 2008). Esses achados levaram a uma iniciativa global para entender o papel da epigenética no desenvolvimento das neoplasias. O fato das alterações epigenéticas, diferentemente das mutações genéticas, serem potencialmente reversíveis e passíveis de restauração ao seu estado normal torna essas iniciativas promissoras e terapeuticamente relevantes (SHARMA; KELLY; JONES, 2009).

A oncologia é um dos focos da epigenética translacional, que tem como principal desafio integrar dados pré-clínicos para obter biomarcadores confiáveis que possam ser medidos com custos aceitáveis na rotina da prática clínica. Nesse sentido, já existem biomarcadores para diagnóstico, prognóstico ou resposta à terapia aprovados pela *Food and Drug Administration* dos EUA (BERDASCO; ESTELLER, 2019).

Os mecanismos epigenéticos mais estudados englobam a metilação do DNA, modificações pós-traducionais nos resíduos de aminoácidos de histonas e regulação de miRNAs não-codificantes. No caso do HCC, uma de suas assinaturas moleculares é um epigenoma profundamente remodelado, caracterizado por hipometilação

genômica global, hiper ou hipometilação de DNA gene-específica, expressão anormal de metiltransferases de DNA e enzimas modificadoras de histonas, padrões de modificação de histonas alterados e expressão aberrante de microRNAs (**Quadro 2**) (POGRIBNY; RUSYN, 2014).

1.2.2.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA ocorre pela adição de um grupo metil nas bases citosina do DNA eucariótico, que são convertidas em 5-metilcitosina pelas enzimas DNA metiltransferase (DNMT). Os resíduos de citosina alterados são, geralmente, os que se encontram imediatamente adjacentes a um nucleotídeo de guanina, nas denominadas ilhas CpG. Quando uma ilha CpG na região promotora de um gene é metilada, a expressão do gene é reprimida. Três DNMTs (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) são necessárias para o estabelecimento e manutenção de padrões de metilação do DNA. A DNMT1 parece ser responsável pela manutenção dos padrões estabelecidos de metilação do DNA durante a transcrição, enquanto as DNMT3a e 3b parecem mediar o estabelecimento de metilações *de novo* em ilhas CpG não metiladas (EDWARDS et al., 2017).

- **Hipometilação genômica global no HCC**

A hipometilação do DNA envolve várias vias e pode ocorrer de forma passiva ou ativa. A perda passiva de citosinas metiladas no genoma pode ser uma consequência da (i) disponibilidade limitada do doador universal de metil S-adenosil-L-metionina, (ii) comprometimento da integridade do DNA ou (iii) expressão e/ou atividade alterada de DNMTs (POGRIBNY, I. ; RUSYN, 2014).

Existem várias consequências moleculares da hipometilação global do DNA que podem contribuir para o desenvolvimento da carcinogênese hepática por meio de múltiplos mecanismos. Especificamente, a hipometilação genômica pode causar uma elevação significativa nas taxas de mutação, levando à instabilidade cromossômica e genômica, além da ativação aberrante de genes promotores de tumor normalmente silenciados (POGRIBNY, I. ; RUSYN, 2014).

- **Hipermetilação gene específica no HCC**

A hipermetilação de promotores de genes específicos está envolvida no silenciamento de genes associados à regulação de processos biológicos vitais, incluindo controle do ciclo celular, apoptose, proliferação celular e metabolismo de xenobióticos. Entre os genes encontrados frequentemente metilados no HCC estão os supressores de tumores, incluindo *RASSF1A*, conforme representado na **Figura 1** (SCHAGDARSURENGIN et al., 2003; TOH; LIM; CHOW, 2019) e *TP53* (POGRIBNY; JAMES, 2002).

A importância da hipermetilação gene específica no desenvolvimento e progressão do HCC se deve à observação deste evento não só no HCC, mas também em condições patológicas pré-malignas no fígado, incluindo hepatite viral crônica B e C e cirrose (POGRIBNY, I. ; RUSYN, 2014).

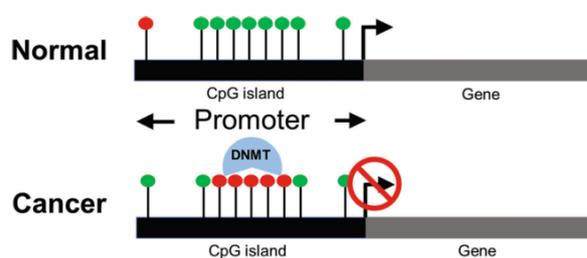


Figura 1. Perfil de metilação do DNA no câncer. No HCC, tipicamente é observada a metilação do DNA nos sítios de promotores de genes supressores de tumor, resultando no silenciamento desses genes supressores. Adaptada de Toh e colaboradores, 2019 (TOH; LIM; CHOW, 2019).

- **Hipometilação gene específica no HCC**

A hipometilação de promotores de genes específicos está relacionada a processos biológicos críticos para a progressão da neoplasia, incluindo proliferação celular, comunicação celular, adesão e mobilidade, transdução de sinal e resistência a fármacos. Diversas evidências indicam que a hipometilação de genes normalmente metilados é significativa no desenvolvimento do HCC (STEFANSKA et al., 2011). Vários genes promotores de tumores, incluindo *uPA*, *HPA*, *SNCG*, *TFF3*, *MAT2A*, *HKII*, *CD147* e *VIM* foram identificados hipometilados no HCC humano primário (POGRIBNY, I. ; RUSYN, 2014).

1.2.2.2 Modificações em histonas

O nucleossomo, unidade básica da cromatina, é composto de duas cópias de cada histona, H2A, H2B, H3 e H4, envolvidas por duas voltas de DNA. Tanto as extremidades N terminais não estruturadas, como os domínios globulares estruturados de cada histona estão sujeitos a modificações pós-traducionais que incluem metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação (LUGER; HANSEN, 2005). Essas modificações de histonas afetam a estrutura da cromatina e também fornecem plataformas de ligação para diversos fatores de transcrição. Assim, modificações de histonas exercem papéis importantes em muitos eventos celulares, incluindo expressão de genes, replicação e reparo de DNA, compactação da cromatina e controle do ciclo celular (JONES; BAYLIN, 2007).

A acetilação de histonas, coordenada pela acetiltransferase de histona (HAT), está normalmente associada a uma conformação menos compactada da cromatina e ao maior acesso de fatores de transcrição, levando à transcrição ativa. Por outro lado, a metilação pode corresponder a um estado ativo ou reprimido da transcrição (POGRIBNY, I. ; RUSYN, 2014). No HCC, a acetilação e a metilação dos resíduos de lisina das histonas são as modificações mais bem estudadas até o momento. É observada também uma desregulação em várias enzimas modificadoras de histonas, incluindo a enzima desacetilase de histona (HDAC). As HDACs são responsáveis pela remoção de um grupo acetil dos resíduos de lisina das proteínas-alvo e apresentam papéis diversos na coordenação da interação de vias de sinalização intracelular por meio da remodelação da cromatina. Vários estudos recentes demonstraram níveis aumentados de HDAC1, HDAC2 e HDAC3 no HCC humano que se correlacionaram com características clínico-patológicas e reincidência de HCC (POGRIBNY, I. ; RUSYN, 2014).

1.2.2.3 microRNAs

Na última década, estudos extensos indicaram a existência e a importância de outro mecanismo epigenético de regulação da função genética por meio de pequenos microRNAs não codificadores (miRNAs). Os miRNAs são reconhecidos como um dos principais guardiões reguladores de genes codificadores de proteínas no genoma humano (BARTEL, 2009). Trata-se de pequenos RNAs não codificadores de 16 a 29 nucleotídeos que funcionam principalmente como reguladores genéticos negativos em nível pós-transcricional.

Expressões aberrantes de miRNAs, tanto de regulação positiva quanto negativa, estão associados a praticamente todos os aspectos biológicos do HCC: (a) progressão neoplásica - por exemplo, miR-21, miR-17-92, miR-155, miR-191, miR-221 e miR-122; (b) invasão e metástase - por exemplo, miR-21 e miR-151; (c) aquisição de resistência celular a vários agentes quimioterapêuticos - por exemplo, miR-21, miR-122 e miR-199a-3p (POGRIBNY, I.; RUSYN, 2014).

Tipo da alteração	Fator envolvido	Função	Resultado da alteração
Epigenética	Hipometilação global do DNA	Globalmente, no HCC o DNA encontra-se hipometilado, favorecendo a transcrição dos genes	Elevação nas taxas de mutação, ativação aberrante de genes promotores de tumor, instabilidade cromossômica
	Hipometilação gene-específica	Alguns genes encontram-se hipometilados, o que facilita a transcrição	Hipometilação de genes promotores de tumor, como CD147, HPA, SNCG (ativação aberrante)
	Hipermetilação gene-específica	Alguns genes encontram-se hipermetilados o que dificulta a transcrição	Metilação de genes supressores de tumor, como o <i>RASSF1A</i> e <i>TP53</i> (silenciamento)
	Histonas	Responsável pelo empacotamento do DNA na cromatina. Controla o acesso à maquinaria de transcrição	Acetilação de histona está associada a uma transcrição ativa, enquanto a metilação pode estar associada a estados ativos ou reprimidos, dependendo do sítio modificado
	MicroRNAs	Pequenos nucleotídeos não-codificantes que funcionam como reguladores negativos em nível pós-transcricional	Expressão aberrante de miRNAs está associada a progressão da neoplasia, invasão e metástase

Quadro 2. Alterações epigenéticas observadas no HCC e seus resultados (LUGER; HANSEN, 2005; POGRIBNY, I. ; RUSYN, 2014; EDWARDS et al., 2017).

1.2.3 Vias de resposta ao dano no DNA no HCC

No contexto das alterações genéticas e epigenéticas, a falha em reparar genes ou alterações genômicas provavelmente decorrentes de danos no DNA pode levar à hepatocarcinogênese e contribuir continuamente para a progressão do HCC. Diversos fatores de risco do HCC são capazes de desencadear uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), conhecidas por induzir estresse e replicação de danos no DNA e por estarem relacionadas aos efeitos antineoplásicos de drogas quimioterápicas potentes (COLIN et al., 2014).

O HCC frequentemente surge em um contexto de lesão crônica e inflamação que promovem danos no DNA e aberrações cromossômicas, que desencadeiam um conjunto imediato de eventos de sinalização conhecidos como vias de resposta ao dano no DNA (DDR). Essas vias de resposta monitoram a estabilidade genômica coordenando o reparo do DNA, a parada do ciclo celular e, finalmente, morte celular ou senescência (YANG et al., 2014), que, em última instância, paralisam a replicação das células danificadas.

As cinco principais vias de reparo de DNA que mantêm a estabilidade genômica em eucariotos são o reparo por excisão de bases, reparo por excisão de nucleotídeos, reparo de incompatibilidade, recombinação homóloga e junção de extremidades não homólogas (GILLMAN et al., 2021). A distinção entre essas vias de reparo é frequentemente ignorada na pesquisa do câncer, provavelmente devido à natureza ampla do dano ao DNA envolvido na progressão do câncer.

Danos no DNA e seu reparo possuem um papel ambíguo na hepatocarcinogênese. Por um lado, a inativação dos mecanismos de reparo do DNA, que aumenta a instabilidade genômica e a mutagênese, é uma característica fundamental do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A mutagênese está relacionada ao aumento da expressão de oncogenes, ou redução da expressão de genes supressores de tumor, o que pode, em ambos os casos, impulsionar o crescimento neoplásico. Por outro lado, a mutagênese descontrolada e a instabilidade genômica podem ser prejudiciais às células neoplásicas devido à mutação de genes cruciais, paralisação das vias de replicação e/ou desencadeamento da apoptose. Dado que a

instabilidade genômica pode ser prejudicial, as células neoplásicas frequentemente evoluem mecanismos para aumentar sua capacidade de reparo de DNA, permitindo que se tornem tolerantes a algum nível de dano ao DNA (GILLMAN et al., 2021).

As aberrações de DDR podem destruir a integridade genômica, desencadear hepatocarcinogênese e facilitar o desenvolvimento avançado do HCC. A DDR tem sido amplamente pesquisada em muitos tipos de câncer nos últimos anos, e se apresenta como um biomarcador preditivo promissor para a resposta à quimioterapia e imunoterapia. Assim, uma melhor compreensão dos papéis das vias de DDR pode facilitar o desenvolvimento de estratégias para tratamento ou prevenção do HCC.

1.2.4 O modelo Cancer Stem Cell de desenvolvimento do HCC

Dentre as hipóteses existentes para explicar a origem do HCC, uma delas sugere que uma única ou uma pequena subpopulação de células hepáticas adquire potencial proliferativo ilimitado e inicia o processo carcinogênico; trata-se do modelo estocástico de carcinogênese (MERLO et al., 2006). Por outro lado, é cada vez mais reconhecido que muitas neoplasias contêm um subconjunto de células que possuem propriedades funcionais características de células-tronco normais, como auto-renovação, capacidade proliferativa ilimitada e pluripotência, levando a um modelo hierárquico de carcinogênese com uma população de *Cancer Stem Cells* (CSC) no ápice da formação de neoplasias malignas.

A hipótese CSC sugere que as alterações epigenéticas, que ocorrem em células-tronco normais ou células progenitoras, são os primeiros eventos do desenvolvimento da neoplasia e são responsáveis não apenas pela iniciação da neoplasia, mas também pela ocorrência de metástases e reincidência local após a terapia (MARQUARDT et al., 2011). A ideia de que esses eventos iniciais ocorrem em populações de células-tronco é sustentada pelo achado comum de que as alterações epigenéticas são alguns dos primeiros eventos que ocorrem em vários tipos de câncer (SHARMA; KELLY; JONES, 2009). Como os mecanismos epigenéticos são centrais para a manutenção da identidade das células-tronco, é razoável esperar que uma desregulação nesses mecanismos possa dar origem a uma população de células progenitoras aberrantes de alto risco, que podem sofrer transformação após mutações genéticas em genes “guardiões“. Tais interrupções epigenéticas podem

levar a um aumento geral no número de células progenitoras, juntamente com um aumento na capacidade de manter seu estado de células-tronco, formando uma população celular de alto risco que pode facilmente se tornar uma neoplasia com a ocorrência de mutações genéticas adicionais (JONES; BAYLIN, 2007).

Estudos demonstram que o HCC iniciado a partir de CSC apresenta maior resistência a fármacos e pior prognóstico (ARAVALLI; CRESSMAN; STEER, 2013). Nesse sentido, a identificação da origem celular do HCC, por meio de abordagens como a de *side population* (SP), que se baseia na propriedade funcional das CSCs de excluir substâncias específicas via transportadores ABCG2, pode ter certas vantagens para o isolamento e caracterização de CSCs do fígado, contribuindo para um direcionamento terapêutico individualizado (MARQUARDT et al., 2011).

1.3 Modelo de hepatocarcinogênese experimental: Hepatócito Resistente

O modelo do “hepatócito resistente” (RH), descrito em 1976 (SOLT, FARBER, 1976) e modificado em 1987 por Semple-Roberts e colaboradores (SEMPLE-ROBERTS et al., 1987), é um dos protocolos experimentais mais utilizados no estudo da hepatocarcinogênese química (KURMA et al., 2021), sendo adequado para induzir elevada incidência de focos de hepatócitos alterados fenotipicamente, denominados lesões pré-neoplásicas (LPN). As LPN podem progredir para nódulos, adenomas e, por fim, para o câncer (FEO et al., 2006). O modelo do RH é útil para avaliar e comparar os efeitos de substâncias quimiopreventivas capazes de modular o processo carcinogênico (FARBER, SARMA 1987). O modelo baseia-se na hipótese de que o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) é capaz de inibir a proliferação da maioria dos hepatócitos normais, mas não a dos iniciados (resistentes).

Nesse modelo, a dietilnitrosamina (DEN), um carcinógeno completo e indireto, funciona como agente iniciador. A metabolização da DEN pelo sistema citocromo P450 origina metabólitos eletrofílicos capazes de alquilar estruturas do DNA. Os hepatócitos iniciados apresentam perfil de metabolização alterado, com níveis diminuídos de enzimas de metabolização como a N-hidroxi-2-acetilaminofluoreno sulfotransferase (BLANCK; WICKSELL; ERIKSSON, 1987).

Assim, sob administração do agente promotor 2-AAF (também um carcinógeno indireto), os hepatócitos iniciados são selecionados, uma vez que o 2-AAF é capaz de inibir a proliferação apenas dos hepatócitos normais, aqueles capazes de efetivar a sua metabolização e dar origem ao seu metabólito tóxico. No dia seguinte após a última dose de 2-AAF, é realizada a hepatectomia parcial a 70%, que é caracterizada como um potente estímulo mitogênico.

O modelo do RH é capaz de reproduzir com grande similaridade a hepatocarcinogênese tal como observada em seres humanos (FEO et al., 2006; ANDERSEN et al., 2010; PETRELLI et al., 2014). Além disso, permite a identificação de diferentes estágios da hepatocarcinogênese, como a iniciação, promoção e progressão, devido à sincronização da indução de focos e nódulos de hepatócitos. Uma das características positivas do modelo do RH é sua propriedade de distinguir lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), consideradas sítios de progressão para o HCC, das que sofrem remodelação (rLPN) para um fenótipo normal do fígado (ANDERSEN et al., 2010). Cerca de 95 a 98% das LPN produzidas no modelo do RH sofrem remodelação, enquanto que 2 a 5% possuem características de pLPN com tendência de evolução para o HCC (FARBER, SARMA, 1987). Tanto as pLPN quanto as rLPN podem ser facilmente identificadas por meio de marcadores específicos, como a glutathione – S- transferase na forma placentária (GST-P) (LIBBRECHT, DESMET, ROSKAMS, 2005; ANDERSEN et al., 2010), conforme ilustrado na **Figura 2**.

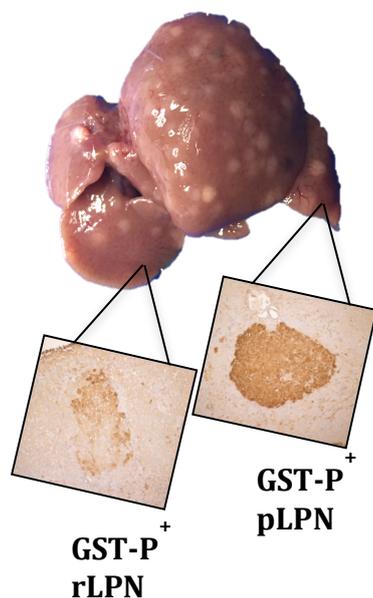


Figura 2. Imagem representativa de nódulos macroscópicos, lesão preneoplásica persistente (pLPN) e lesão preneoplásica em remodelação (rLPN) em fígado de rato submetido ao modelo do hepatócito resistente. Marcação imunoistoquímica com glutationa-S-transferase na forma placentária (GST-P⁺), objetiva 10x.

1.4 Alimentação e carcinogênese

Ainda no início da década de 1980, estimava-se que 35% das mortes por câncer nos EUA poderiam estar relacionadas a alimentação (DOLL; PETO, 1981). Nessa época, sugeriu-se que a alimentação seria um contribuinte tão importante para a carcinogênese quanto o uso de tabaco. Essa relação alimentação/câncer permaneceu bastante consistente com o passar das décadas. Existe consideravelmente mais informações disponíveis agora do que há 40 anos sobre os papéis da atividade física, sedentarismo e obesidade no risco e na mortalidade do câncer (BLOT; TARONE, 2015). Além disso, já foram identificadas inúmeras propriedades biológicas dos nutrientes: alguns são antioxidantes, previnem danos no DNA, suprimem a expressão de genes relacionados à carcinogênese, estimulam fatores de crescimento e modulam níveis hormonais, assim como o sistema imunológico.

O consumo de frutas, hortaliças, peixes e seus óleos pode ser associado a um efeito preventivo ou protetor ao desenvolvimento de neoplasias. Especificamente para o câncer de fígado, existe evidência de que o café está inversamente correlacionado

com o risco de HCC (WCRF/AICR 2018). Por outro lado, a ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas, consumo de bebidas alcóolicas, aumento da massa de gordura corporal e a inatividade física parecem estar relacionados com uma maior incidência da doença (WCRF/AICR 2018).

1.5 Quimioprevenção do câncer com compostos bioativos dos alimentos

A quimioprevenção do câncer foi definida pela primeira vez em 1976 e pode ser considerada uma forma de prevenir a doença por meio da intervenção com compostos sintéticos ou naturais durante as etapas de iniciação e promoção da carcinogênese, ou seja, antes do estabelecimento da malignidade (HONG; SPORN, 1997).

De acordo com a classificação originalmente proposta por Lee Wattenberg, quimiopreventivos podem ser distribuídos em dois grupos: agentes bloqueadores e supressores (WATTENBERG, 1985). Agentes bloqueadores atuam mais especificamente durante a fase de iniciação e impedem que os carcinógenos atinjam seus alvos, sejam submetidos à ativação metabólica ou interajam com macromoléculas celulares cruciais (por exemplo, DNA, RNA e proteínas). Os agentes supressores, por outro lado, atuam na fase de promoção e inibem a transformação maligna das células iniciadas (SCHULZE et al., 2015).

Dentre os vários agentes quimiopreventivos já identificados, a maioria deles compreende compostos bioativos dos alimentos (CBAs) (STAN et al., 2008). Esses compostos possuem grande diversidade química e biológica e ampla variedade de alvos moleculares, o que torna a pesquisa nessa área, além de importante, também complexa e desafiadora.

Compostos bioativos alimentares são biomoléculas não essenciais, extensivamente presentes na dieta, que possuem a capacidade de controlar mais de uma via metabólica, o que ajuda a conferir efeitos benéficos a várias doenças (GANESAN; JAYACHANDRAN; XU, 2018). Um amplo conhecimento baseado em estudos *in vivo* fornece suporte aos potenciais efeitos quimiopreventivos de vários

CBAAs no HCC, que modulam uma série de alvos moleculares que levam a eventos chave (ONG; MORENO, 2020), como por exemplo:

- 1) **Indução da apoptose:** ácido butírico, epigallocatequina-3-galato e β -ionona;
- 2) **Inibição da proliferação celular:** β -caroteno, epigallocatequina-3-galato, β -ionona, licopeno, ácido butírico e retinóides;
- 3) **Inibição de fatores que promovem a angiogênese:** ácido butírico, geranilgeraniol, β -ionona e ácido fólico.

1.6 Tributirina

A fermentação de fibras alimentares por meio de bactérias colônicas tem como produto ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), entre eles, o ácido butírico (AB) (BURKITT, 1969). Trata-se de um ácido graxo de 4 carbonos com grande potencial anticarcinogênico, com ações observadas *in vitro* e *in vivo* em vários modelos de carcinogênese (C VELÁZQUEZ; M LEDERER; L ROMBEAU, 1997; HEIDOR et al., 2012). Suas principais atividades estão relacionadas a inibição da proliferação celular e indução da apoptose (HEIDOR et al., 2012), entretanto, sua utilização *in vivo* é limitada devido a sua meia-vida curta de apenas 14 minutos e dificuldade de serem alcançadas concentrações plasmáticas efetivas.

Assim, uma alternativa com propriedades farmacocinéticas favoráveis é a tributirina (TB), pró-fármaco natural do ácido butírico (HEIDOR et al., 2012) encontrada em laticínios. Trata-se de um triacilglicerol constituído por três moléculas de ácido butírico esterificadas na molécula do glicerol, ou seja, um mol deste triacilglicerol, quando hidrolisado, fornece 3 mols de AB. Em ratos submetidos a modelo de hepatocarcinogênese e tratados com TB, tanto nas fases de iniciação e promoção, quanto apenas promoção, foi observada atividade quimiopreventiva da TB relacionada ao aumento das concentrações teciduais de ácido butírico (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; DE CONTI et al., 2012; HEIDOR et al., 2014).

Em estudo experimental de hepatocarcinogênese em ratos, as principais ações observadas com a administração de TB foram a inibição do desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, indução da apoptose, aumento dos níveis de p21 e redução de

acúmulo aberrante de p53 citoplasmático (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009). Além disso, a TB se mostrou uma importante inibidora de desacetilase de histonas, aumentando o acesso de fatores de transcrição ao DNA (DE CONTI et al., 2012).

Recentemente, a atuação da TB como um agente antiangiogênico foi observada nos estágios iniciais da hepatocarcinogênese. Essa atividade se dá por meio da inibição da ativação de ERK, um dos responsáveis pela regulação da síntese e ativação do fator induzível por hipóxia 1 α (Hif-1 α). A redução de Hif-1 α pela TB limita a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), responsável pela neovascularização (ANDRADE et al., 2019). Como a angiogênese é um evento que ocorre já nos estágios iniciais da hepatocarcinogênese e é um processo crucial para o desenvolvimento do HCC, a atividade antiangiogênica da TB que já ocorre em fígados pré-neoplásicos, reforça seus potenciais efeitos quimiopreventivos no HCC.

1.7 Tricaprilina

A tricaprilina (TC) é um triacilglicerol, que apresenta três moléculas de ácido caprílico (AC) interesterificadas na molécula de glicerol. O AC é um ácido graxo de cadeia média (C:8:0), e, junto com o ácido cáprico e o ácido caprótico, constitui 15% dos ácidos graxos encontrados no leite de cabra (OKOKO, 2007). O AC também é encontrado na gordura de outros tipos de leite e no óleo de coco.

Em estudo *in vitro* com ácidos graxos de cadeia média, o AC demonstrou significativa atividade antineoplásica em células humanas de câncer colorretal, de pele e de mama e que poderia potencialmente ser usado para prevenir e/ou tratar esses cânceres (NARAYANAN et al., 2015). Nenhum estudo *in vivo*, por outro lado, foi realizado até o momento para verificar a potencial atividade relacionada a indução da apoptose observada *in vitro*.

O AC está presente em várias formulações farmacêuticas que se encontram em estudos clínicos de fase III, nas quais atua como potencializador de absorção da via paracelular de absorção intestinal por meio da modulação das *tight junctions* (TJ), do inglês, junções de oclusão (MCCARTNEY; GLEESON; BRAYDEN, 2016), conforme a **Figura 3**. De acordo com estudos recentes, a barreira intestinal poderia

ser regulada por fatores dietéticos, embora os mecanismos precisos subjacentes à regulação dietética permaneçam pouco esclarecidos (SUZUKI, 2020).

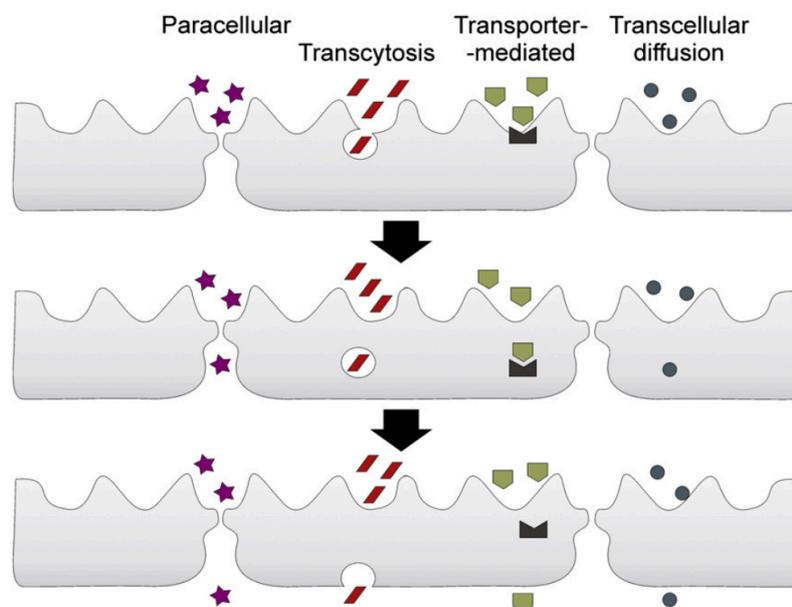


Figura 3. Representação esquemática de quatro vias de absorção intestinal: via paracelular, transcitose, mediada por transportador e difusão transcelular Adaptado de Kosińska e colaboradores, 2013 (KOSIŃSKA; ANDLAUER, 2013).

1.7.1 Tight junctions

Os complexos de proteínas que conectam células epiteliais incluem junções aderentes, junções GAP, desmossomas e *tight junctions* (TABARIÈS; SIEGEL, 2017). As TJ estão tipicamente localizados no lado apical, enquanto as junções aderentes, junções GAP e os desmossomas estão localizados na membrana basolateral (HARTSOCK; NELSON, 2008). Os complexos juncionais circundam as células, resultando em um cinto contínuo que interconecta as células vizinhas. Pelo menos 40 proteínas diferentes estão envolvidas na formação de TJ (FURUSE, 2010). Elas desempenham muitos papéis relacionados a polaridade celular, sinalização, regulação transcricional, ciclo celular, tráfico de vesículas, além da formação da barreira paracelular (KOSIŃSKA; ANDLAUER, 2013).

As proteínas da membrana que caracterizam as TJ compreendem zônulas de oclusão, ocludinas, moléculas de adesão juncional, tricelulina e claudinas. Nos seres

humanos, as claudinas constituem uma família de mais de 20 proteínas, e são as principais responsáveis pela regulação do transporte paracelular epitelial (FURUSE, 2010; VAN ITALLIE; ANDERSON, 2006; YAMAZAKI et al., 2011). As claudinas podem exercer propriedades de barreira ou canal paracelular, dependendo da claudina. Em uma TJ preexistente, as claudinas formadoras de barreira podem causar um aumento adicional na resistência paracelular, enquanto as claudinas formadoras de poros, quando inseridas nessa TJ, causam uma diminuição na resistência paracelular (GÜNZEL; YU, 2013).

Além dessas importantes funções estruturais, as claudinas também atuam como polos de sinalização (ZEISEL; DHAWAN; BAUMERT, 2019). Alterações na expressão ou função de claudinas e/ou a interrupção da integridade das TJ estão associadas a uma variedade de doenças, incluindo o câncer. É bem estabelecida a expressão aberrante de diversas claudinas em vários tipos de câncer, tanto positivamente, quanto negativamente (KOMINSKY, 2006). Porém, ainda não é claro o papel dessas proteínas na carcinogênese e na progressão das neoplasias (ZEISEL; DHAWAN; BAUMERT, 2019).

Com base no papel de adesão intercelular das claudinas, foi levantada a hipótese de que a expressão reduzida destas, em cânceres metastáticos, aumentaria a mobilidade e invasão das células neoplásicas. Por outro lado, a hiperexpressão de certas claudinas pode resultar na localização e função aberrante dessas proteínas em certos tipos de câncer (TABARIÈS; SIEGEL, 2017). Assim, é possível que níveis anormalmente elevados ou, inversamente, a perda da expressão de claudina possam resultar em alterações estruturais e funcionais nas TJ comumente observadas em neoplasias (TABARIÈS; SIEGEL, 2017).

No fígado, as TJ podem ser encontradas em dois locais, associadas aos hepatócitos ou às células epiteliais do ducto biliar (colangiócitos) (LEE; LUK, 2010). As claudinas 1-3, 5-9 e 14 são expressas no fígado (GÜNZEL; YU, 2013) e podem ter expressões alteradas na carcinogênese. No HCC, é observado um aumento na expressão das claudinas 1 e 7 (ZEISEL; DHAWAN; BAUMERT, 2019).

1.8 Lipídios Estruturados

Lipídios estruturados (EST) podem ser definidos como triacilgliceróis modificados ou reestruturados a fim de alterar a composição ou distribuição de ácidos graxos nas moléculas de glicerol (SILVA; GIOIELLI, 2009). Isso se dá por meio de métodos químicos, enzimáticos ou engenharia genética (CASTRO et al., 2004). Dada a capacidade de combinar características benéficas de ácidos graxos em uma molécula de glicerol, a modificação de lipídios é bastante utilizada em indústrias alimentícias com o objetivo de alterar propriedades físico-químicas de triacilgliceróis, bem como suas propriedades nutricionais, com a diminuição de ácidos graxos saturados, por exemplo (CABALLERO et al., 2014). Essas modificações podem incorporar novos ácidos graxos ou alterar a posição dos ácidos graxos existentes na estrutura do glicerol.

1.8.1 Formas de produção de EST

As estratégias de modificação de lipídios para a produção de gorduras e óleos funcionais incluem a produção de concentrados de ácido graxo poliinsaturados usando fungos e algas; a engenharia genética de lipídios vegetais e a interesterificação e/ou reações de acidólise catalisadas quimicamente ou por lipase (OSBORN; AKOH, 2002). Em termos de modificação pós-produção de óleos vegetais, as reações de interesterificação catalisadas por lipase e as quimicamente catalisadas são os principais métodos de escolha (WILLIS; MARANGONI, 1999).

1.8.1.1 Interesterificação química

A interesterificação química é barata e facilmente escalonável. Entretanto, a reação carece de especificidade e oferece pouco ou nenhum controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final (WILLIS; MARANGONI, 1999). A reação, catalisada por metais alcalinos ou alquilados metálicos, requer elevadas temperaturas e condições anidras. Além dos triacilgliceróis aleatórios desejados, uma série de produtos indesejados também são obtidos a partir desta reação e podem ser difíceis de remover (OSBORN; AKOH, 2002).

1.8.1.2 Interesterificação enzimática

Reações de interesterificação catalisadas por lipases, incluindo transesterificação e acidólise, oferecem a vantagem de maior controle sobre a distribuição posicional de ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases 1,3-específicas (OSBORN; AKOH, 2002). No entanto, as dificuldades associadas ao aumento de escala e controle do processo, bem como o alto custo das lipases, impediram seu uso industrial generalizado como catalisadores para a modificação de lipídios alimentares (IWASAKI; YAMANE, 2000). As reações de transesterificação e acidólise catalisadas por lipase são uma combinação de reações de hidrólise e esterificação, nas quais o grau em que a hidrólise ocorre em relação à esterificação é governado pela concentração de água presente (WILLIS; MARANGONI, 1999).

1.8.2 EST no contexto da quimioprevenção

No contexto da quimioprevenção, os EST podem ser uma alternativa para a associação de um ou mais compostos bioativos, a fim de potencializar/combinar seus efeitos biológicos. A administração, por via oral em ratos, de uma emulsão lipídica constituída por celestrol, oleato de colesterol, fosfatidilcolina e tributirina por Su e colaboradores (SU et al., 2006) demonstrou um aumento significativo na concentração plasmática de ácido butírico, quando comparado a administração isolada de TB na mesma dose.

Com base nessa observação, foi desenvolvido um sistema de carreamento utilizando ácidos graxos com propriedades capazes de aumentar os efeitos terapêuticos de fármacos antineoplásicos. O estudo realizado por Heidor e colaboradores mostrou que os EST obtidos pela interesterificação enzimática a partir da tributirina e do óleo de linhaça apresentaram atividade quimipreventiva da hepatocarcinogênese (HEIDOR et al., 2016). O nosso grupo observou que estes EST, quando administrados em ratos submetidos a modelo de hepatocarcinogênese, atuaram na inibição de proteínas modificadoras de cromatina, como HDAC4 e HDAC6, que tem seus níveis elevados durante a hepatocarcinogênese; redistribuição subcelular da proteína p53 e diminuição do dano ao DNA e atividade da telomerase (ORTEGA et al., 2021).

Tendo em vista as propriedades quimiopreventivas bastante evidenciadas do ácido butírico no HCC e a atividade potencializadora da absorção do ácido caprílico, além da sua possível atividade quimiopreventiva *in vivo*, a interesterificação enzimática da tributirina com a tricaprilina, representada na **Figura 4**, mostra-se uma estratégia interessante para aumentar a biodisponibilidade do ácido butírico e combinar seus efeitos quimiopreventivos com os do ácido caprílico. Nesse sentido, espera-se que o lipídio estruturado carreador de ácido butírico aumente as concentrações hepáticas de ácido butírico, assim como seus efeitos quimiopreventivos no HCC.

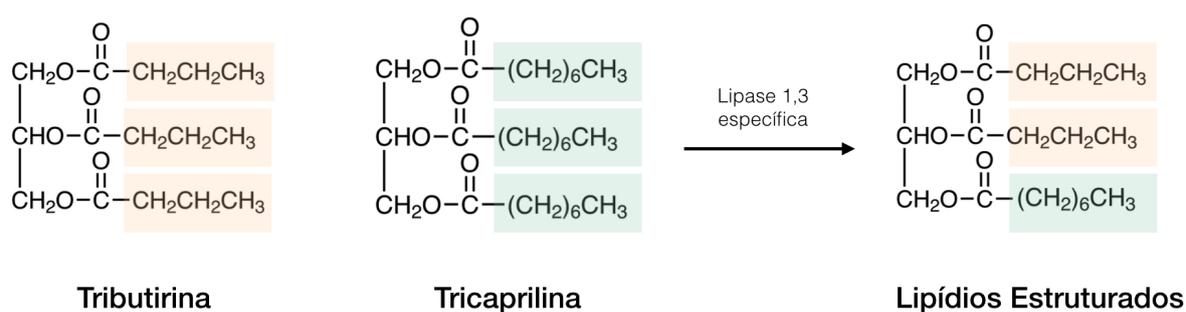


Figura 4. Representação esquemática da interesterificação enzimática da tributirina com a tricaprilina pela ação da lipase 1,3 específica, dando origem a lipídios estruturados.

2 Objetivo

O trabalho tem como objetivo produzir lipídios estruturados a partir de triacilgliceróis fontes de ácido butírico e ácido caprílico – tributirina e tricaprilina, respectivamente – e avaliar o seu potencial quimiopreventivo nas fases de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese experimental em ratos Fischer-344 submetidos ao modelo do hepatócito resistente.

3 Material e métodos

3.1 Preparo dos EST

Para o preparo dos EST foi utilizada uma mistura de TB (97% Aldrich, EUA) e TC (99% Sigma, EUA) na proporção 1,6:1,0 (massa:massa) ou 2,5:1,0 (mol:mol). A mistura foi interesterificada em um reator tubular de vidro com 70 g da lipase 1,3 específica de *Thermomyces lanuginosa* imobilizada (Lipozyme TL IM, Novozymes, Brasil) com atividade de 250 IUN/g. Inicialmente, óleo de soja foi introduzido no reator com fluxo de 1mL/min para a remoção de água e bolhas de ar da enzima. Após a temperatura do reator atingir 60°C, a mistura de TB com TC foi bombeada para o mesmo com fluxo de 1mL/min (tempo de residência de 1h). Para evitar possíveis contaminações com os ácidos graxos do óleo de soja, foram descartados os primeiros 200 mL do produto interesterificado (SILVA et al., 2012). O tempo de residência da mistura no reator foi de 1h e o produto interesterificado foi coletado em frasco apropriado e armazenado a 4°C. A síntese e caracterização dos lipídios estruturados foram realizadas no Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, com a colaboração da Prof. Juliana Neves Rodrigues Ract.

3.2 Composição de triacilgliceróis dos EST

As amostras de TB, TC e EST foram dissolvidas em acetona (5 mg/L) e diretamente analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Shimadzu 9 Prominence 20A; Shimadzu Corporation, Japão), equipado com detector de espalhamento de luz Shimadzu ELSD-LTII e duas colunas Supelcosil TM C18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm). Os picos foram identificados com padrões de triacilgliceróis puros e foi considerada a ordem da eluição de acordo com o número de carbono equivalente. As análises foram conduzidas em duplicatas e os resultados foram expressos como valores médios.

3.3 Ensaio *in vivo*

3.3.1 Modelo de hepatocarcinogênese do Hepatócito Resistente (RH)

Para a indução da hepatocarcinogênese foi utilizado o modelo do RH (SEMPLE - ROBERTS et al., 1987). Assim, os animais receberam, por via intraperitoneal, uma única dose (15 mg/100g p.c) do agente iniciador DEN dissolvido em solução de cloreto de sódio a 0,9%. Após um período de recuperação de 2 semanas, os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses em dias consecutivos, por gavagem, de 2-AAF na dose de 1,5 mg/100g p.c. dissolvido em solução de dimetilsulfóxido 0,015% em óleo de milho. Vinte e quatro horas após a última administração de 2-AAF os animais foram submetidos a uma hepatectomia parcial a 70% sob anestesia com isoflurano (MICHAEL et al., 2017). Seis semanas após a administração da DEN, os animais foram eutanasiados.

3.3.2 Protocolo Experimental

Foram utilizados ratos machos Fischer-344 (F-344), recém-desmamados, pesando inicialmente entre 80-90g e obtidos da colônia do biotério do CEMIB - UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (2-3 ratos/gaiola) com tampas de aço inoxidável contendo maravalha esterilizada. Água e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Brasil) foram oferecidas *ad libitum* durante todo o experimento, e seus pesos foram controlados diariamente. O ensaio biológico foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Animais de Experimentação (Protocolo CEUA/FCF-USP 566) em ambiente apropriado para condução de estudos de carcinogênese, à temperatura de 22°C ± 2°C e ciclo de iluminação claro-escuro de 12 h (07h – 19h claro; 19h – 07h escuro).

Para o ensaio biológico, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- **Grupo não iniciado (NI):** composto por 4 animais que não foram submetidos ao modelo do RH, nem tratados.
- **Grupo maltodextrina (MD):** composto por 7 animais que foram submetidos ao modelo do RH e receberam maltodextrina (Nidex®, Nestlé, Brasil; 300 mg/100g p.c./dia) como controle isocalórico, por gavagem.
- **Grupo tributirina (TB):** composto por 7 animais que foram submetidos ao modelo do RH e tratados com tributirina por gavagem (200mg/100g p.c./dia).
- **Grupo tricaprilina (TC):** composto por 10 animais que foram submetidos ao modelo do RH e tratados com tricaprilina por gavagem (150mg/100g p.c./dia).
- **Grupo estruturado (EST):** composto por 9 animais que foram submetidos ao modelo do RH e tratados com lipídios obtidos por interesterificação enzimática da tributirina com a tricaprilina por gavagem (180mg/100g p.c./dia).

As doses dos EST e TC foram calculadas para fornecerem a mesma quantidade energética da TB [6 Kcal, na dose de 200 mg/100g de peso corporal (p.c)] já que com esta foi observada atividade quimiopreventiva na hepatocarcinogênese experimental (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012). Assim, foram considerados os percentuais molares dos ácidos graxos presentes no EST e TC, obtidos conforme descrito no item 3.2 e seus respectivos calores de combustão de acordo com o CRC Handbook (2005). A hidrólise completa foi considerada para o cálculo, ou seja, um mol de triacilglicerol fornece, para efeito de cálculo, 3 moles de ácidos graxos e um de glicerol. Como os lipídios estruturados, em sua maioria, apresentaram, como esperado, a proporção molar de 2:1 (ácido butírico : ácido caprílico), a dose dos EST foi de 180mg/100g p.c. e a de TC foi de 150 mg/100g p.c. Foi utilizada, ainda, maltodextrina (MD) como controle isocalórico da TB, na dose de 300mg (KUROIWATRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012; GUARIENTO et al., 2014). Os animais receberam os tratamentos durante 8 semanas consecutivas (**Figura 5**).

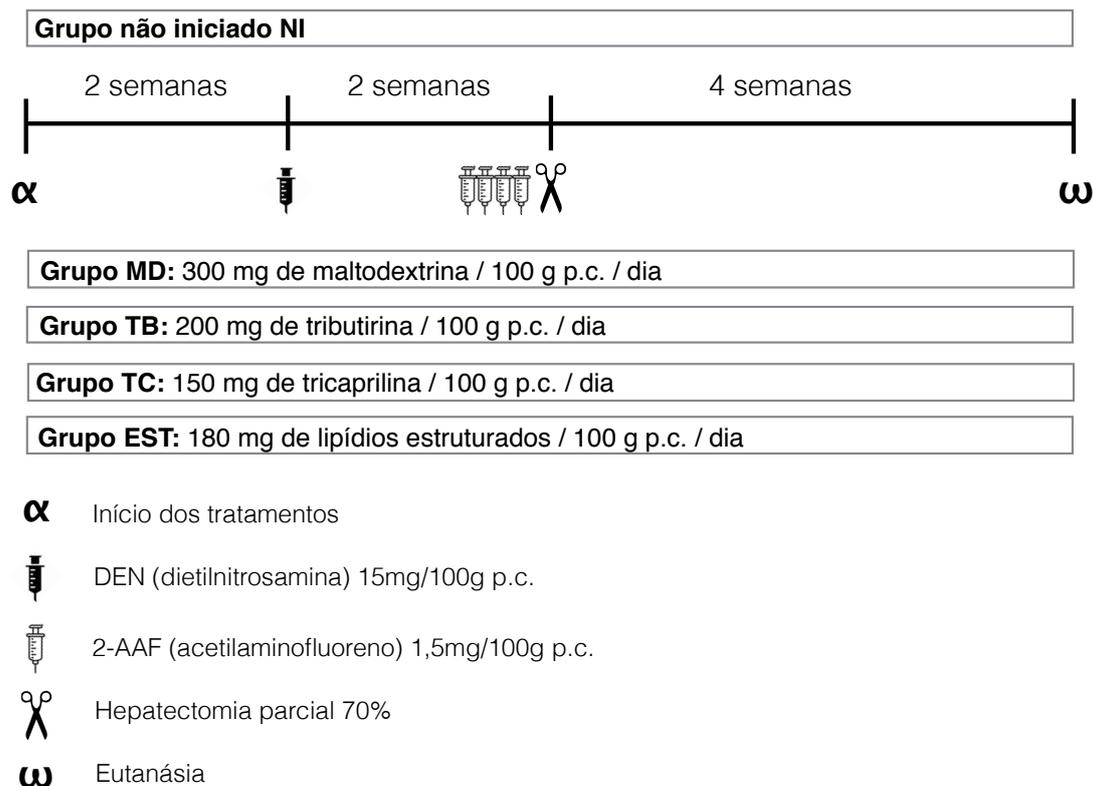


Figura 5. Desenho experimental. Modelo do hepatócito resistente.

3.3.3 Eutanásia dos animais

Para a eutanásia, os animais permaneceram em jejum por 6 horas e foram pesados e tratados 2h antes do procedimento. A eutanásia ocorreu por choque hipovolêmico por ocasião da secção da aorta abdominal sob anestesia com isoflurano (indução com 4% e manutenção com 2%). Em seguida, o fígado foi coletado, lavado em solução salina gelada a 0,9% e pesado em balança digital, seguindo-se, então, o exame macroscópico do mesmo. Foi também retirado um fragmento do duodeno para ser utilizado como controle da proliferação celular.

3.3.4 Exame macroscópico do fígado

O fígado de cada animal foi examinado individualmente quanto à presença em sua superfície de formações nodulares de coloração, em geral, esbranquiçada ou amarelada que se distinguem do parênquima hepático. Após o exame, cada lobo foi seccionado em fatias de aproximadamente 0,3 cm de espessura, para identificação e contagem dos nódulos. Posteriormente, esses segmentos foram colhidos e fixados em

formalina tamponada a 4% por 48 horas e depois permaneceram em álcool a 70% para posterior análise imunoistoquímica. O restante dos lobos hepáticos foi devidamente identificado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer (Revco, EUA) a -80° C.

3.4 Análise morfométrica e da proliferação celular

Para avaliar o número, tamanho e a classificação das LPN, assim como a proliferação celular, foi realizada a dupla marcação imunoistoquímica para GST-P e PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), respectivamente. As lâminas com os cortes histológicos a 5µm, foram desparafinizadas, hidratadas, e posteriormente colocadas em panela de pressão com tampão citrato 1x por 3 minutos sob pressão de 15 a 20 psi. Depois de atingirem a temperatura ambiente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 10% em PBS, durante 30 min. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de leite em pó desnatado 3% em PBS e, posteriormente, incubadas com o anticorpo primário anti-PCNA (DAKO, Dinamarca) na diluição de 1:250 em albumina sérica bovina 1% (BSA 1%) por 16 horas a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram tratadas com anticorpo secundário Mach4 Universal HRP Polymer (Biomedical care, EUA) por 1h e reveladas por reação com diaminobenzidina (DAB – Dako, Dinamarca). A fosfatase alcalina foi bloqueada com levamisole (Dako, Dinamarca) durante 30 min, e, em seguida, ocorreu a incubação com o anticorpo anti-GST-P (MBL, Japão), na diluição de 1:500 por 2h a temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram tratadas com polímero conjugado a fosfatase alcalina (Dako cytomation EnVision, Dinamarca) por 30 min, reveladas com Permanent Red (Dako, Dinamarca) e contra coradas com Hematoxilina de Harris (CARDOZO et al., 2011). Entre todas as etapas foram realizadas 3 lavagens dos cortes de 5 minutos com PBS 1x. A análise das lâminas foi realizada em microscópio com platina motorizada (Imager.M2, Zeiss, Alemanha) acoplado a sistema de análise de imagens AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha). A morfometria foi expressa na forma de número e tamanho de pLPN (**Anexo 1A**) ou rLPN (**Anexo 1B**) e a porcentagem da área do corte histológico ocupado pelas lesões. A quantificação da proliferação celular foi expressa na forma de % de núcleos de hepatócitos positivos para PCNA (**Anexo 1C**) em pLPN ou rLPN, ou área de tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding), tanto dos grupos submetidos ao modelo do RH,

como no grupo não iniciado (NI).

3.5 Avaliação da apoptose

Para a avaliação da apoptose, foi utilizado o kit comercial ApopTag® Peroxidase in situ Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich, EUA) que detecta células apoptóticas *in situ* marcando fragmentações na fita de DNA pelo método TUNEL (do inglês, *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling*) (**Anexo 1D**). Resumidamente, as lâminas com os cortes histológicos a 5µm foram desparafinizadas e hidratadas; em seguida, os cortes foram pré-tratados com proteinase K por 15 minutos, seguida de peróxido de hidrogênio para bloqueio da peroxidase endógena, por 5 minutos. O tampão de equilíbrio foi então aplicado nos cortes de acordo com as instruções do manual. Os cortes foram incubados com a enzima desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) por 1 hora em câmara úmida a 37°C e posteriormente lavados com a solução de lavagem de modo a interromper a reação. O conjugado anti-digoxigenina foi então aplicado aos cortes, que foram incubados em câmara úmida a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS e o substrato de peroxidase foi aplicado para o desenvolvimento de cor. A coração foi realizada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Os cortes foram então imediatamente lavados com dH₂O e contra corados com verde de metila (Sigma-Aldrich, EUA). A análise das lâminas foi realizada em microscópio com platina motorizada (Imager.M2, Zeiss, Alemanha) acoplado a sistema de análise de imagens Axio Vision. Para a análise, foram selecionadas 1000 células de cada tipo de lesão, pLPN e rLPN, assim como de tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding). A quantificação da apoptose foi expressa na forma de % de corpúsculos apoptóticos marcados em pLPN, rLPN ou surrounding, tanto dos grupos submetidos ao modelo do RH, como no grupo não iniciado (NI).

3.6 Avaliação do índice de crescimento ajustado

O cálculo do Índice de Crescimento Ajustado (ICA) foi realizado por meio da razão entre o índice de proliferação celular e o índice apoptótico (MAZZANTINI; DE CONTI; MORENO, 2008), determinados nos itens 3.4 e 3.5, respectivamente. De acordo com esta fórmula, quando o índice de proliferação (valor do numerador) for

maior que o índice apoptótico (valor do denominador), o ICA será maior que 1 (predomínio da proliferação celular em relação à apoptose). Por outro lado, o ICA menor que 1 indica a condição oposta (predomínio de apoptose em relação a proliferação celular).

3.7 Determinação das concentrações hepáticas de ácido butírico e caprílico

A determinação das concentrações hepáticas de ácido butírico e caprílico foi realizada pelo professor Dr. Eduardo Purgatto do Departamento de Ciências dos Alimentos da FCF/USP, de acordo com Kuroiwa Tzmielina e colaboradores (2009), com adaptações. Amostras congeladas de fígado foram homogeneizadas com solução 50 mM de PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto – inibidor de proteases) e acetonitrila, além do padrão interno, éster etilbutírico (Sigma, EUA) ou caprilato de etila (Sigma, EUA). A quantificação foi feita em cromatógrafo a gás HP6890 (Agilent, Palo Alto, California) equipado com coluna CP Wax 58- FFAP (25 m × 0.32 m × 0.2 µm), acoplado a espectrofotômetro de massas HP5973 (Agilent, EUA).

3.8 Cometa neutro

O nível do dano no DNA foi avaliado pelo ensaio do cometa neutro, que é classicamente utilizado para avaliar danos no DNA relacionados a quebras de fitas simples e dupla, sítios com reparo incompleto, além de ligações cruzadas de DNA com proteínas ou com o próprio DNA. Neste ensaio, a forma, tamanho e quantidade de DNA dentro do cometa desempenham papéis importantes na determinação do nível de dano (KUMARAVEL et al., 2009). Neste ensaio, o rompimento das fitas do DNA foi avaliado em amostras de fígado armazenadas a -80 ° C. Os tecidos foram homogeneizados em PBS a 4°C. As células isoladas foram imobilizadas em uma matriz de agarose de baixo ponto de fusão em uma lâmina de microscopia. Posteriormente, essas células foram lisadas em uma solução de tampão TBE (Tris 90 mM, H3BO3 90 mM e Na2-EDTA 2 mM, pH 8,4) e SDS 2,5% e submetidas à eletroforese horizontal em tampão TBE a 2 V/cm de distância entre os eletrodos por 2

minutos. Após a fixação com ácido tricloroacético, os cometas resultantes foram corados com nitrato de prata. Os comprimentos do cometa foram analisados em um microscópio de luz (Axio Imager.M2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemanha) com ampliação de 50x com software de análise de imagem (software AxioVision, versão 4.8, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha). Um total de 100 cometas por animal foi analisado. A viabilidade das células do fígado foi determinada pela análise das imagens do cometa após a coloração com prata. O cometa foi considerado não viável quando apresentou uma aparência "em forma de nuvem" ou uma cabeça muito pequena em relação à cauda lembrando a forma de um pino ou balão. Nesse caso as células possivelmente eram necróticas ou apoptóticas. A viabilidade da suspensão celular foi considerada aceitável quando a frequência dessas imagens foi inferior a 2% (BARBISAN et al., 2003). Aqui, o dano no DNA foi quantificado de acordo com o comprimento dos cometas em μm , uma vez que existe uma relação direta entre essa variável e o dano no DNA (McCarthy et al., 1997).

3.9 Western blot

As histonas de fígado de ratos foram extraídas em solução ácida de acordo com o kit comercial *Histone Extraction Kit* - ab113476 (Abcam, UK). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A análise dos níveis de expressão da proteína γH2AX foi realizada por western blot. Para tanto, 50 μg de proteínas histonas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 15% (SDS-PAGE) imerso em tampão tris-glicina em cuba de eletroforese vertical Mini Tetra Cell (Bio-Rad, EUA) por aproximadamente 2h a 120V. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-ECLTM, poro 0,2 μm (GE Healthcare, Suécia) overnight a 4°C. A eficiência da transferência foi verificada com a coloração da membrana com Ponceau-S (UBS, EUA), e, em seguida lavada com tampão PBS (NaCl 137 Mm; Na₂HPO₄ 10 Mm; KCl 2,68 Mm; KH₂PO₄ 1,76 Mm e Tween 1% em água). O bloqueio da membrana foi realizado com solução de leite desnatado Molico 5% (Nestle, Suíça) por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada com tampão PBST (NaCl 137 Mm; Na₂HPO₄ 10 Mm; KCl 2,68 Mm; KH₂PO₄ 1,76 Mm e Tween 1% em água) e incubada com o anticorpo γH2AX (Cell Signaling,

EUA) na diluição 1:1000 em TBS-T por 16 horas a 4°C. Após a incubação da membrana com anticorpo primário específico, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP anti-imunoglobulina de coelho (Amersham Biosciences, Suécia) na diluição 1:10000 em TBS-T por 2h. A detecção das proteínas foi realizada por quimioluminescência com o conjunto de reagentes específico ECL Advanced (GE Healthcare, Suécia). A intensidade das bandas será quantificada por densitômetro (Modelo GS-700 Imaging Densitometer, BIO-RAD, EUA) com software específico (Molecular Analyst, BIO-RAD, EUA). Para esse experimento foi utilizado n de 3 animais por grupo experimental. A intensidade das bandas da γ H2AX foi normalizada com as bandas produzidas pela histona H1 (Upstate, EUA) na diluição 1:1000 em TBS-T. Os resultados foram expressos como *fold change* de intensidade de banda em relação ao grupo controle MD.

3.10 Sequenciamento do RNA e análises de bioinformática

O RNA foi extraído das amostras de tecido hepático de acordo com o kit comercial RNeasy (Qiagen, Alemanha). As amostras foram enviadas para Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Alemanha), onde o sequenciamento do RNA foi realizado pelo grupo do Prof. Jens Marquardt utilizando o Illumina HiSeq4000 (Illumina, EUA). Um n de 3 amostras por grupo foi utilizado para as análises subsequentes.

As análises de bioinformática foram realizadas na Universität zu Lübeck, durante o período do Doutorado Sanduíche realizado sob a supervisão do Prof. Marquardt. Mapas de calor (do inglês, *Heatmaps*) e análises de componentes principais (PCA) foram usados para demonstrar os padrões de expressão desses genes diferencialmente expressos. Além disso, análises obtidas pelo software Ingenuity Pathway Analysis® da QIAGEN (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity) foram realizadas para identificar vias, doenças, funções canônicas e redes de genes que são mais significativos para os resultados de microarrays e para categorizar genes diferencialmente expressos em doenças e funções específicas.

A análise de *gene set enrichment analysis* (GSEA) também foi utilizada para identificar possíveis vias alteradas após os tratamentos realizados e que pudessem atuar como alvos quimiopreventivos do HCC. Essa análise permite a associação de um dado módulo com determinados fenótipos de estudo, por exemplo, grupos de amostras e é capaz de integrar dados de expressão com informações de interações proteína-proteína, o que pode ser útil para a identificação de reguladores-chave.

3.11 Ensaios *in vitro*

Para os ensaios *in vitro* foram utilizadas duas linhagens celulares, a primeira, *Transformed Human Liver Epithelial-5B* (THLE-5B), é uma linhagem celular não tumorigênica de hepatócito humano imortalizado. A segunda, Huh7, é uma linhagem celular de carcinoma derivada de hepatócitos bem diferenciada, originalmente retirada de um tumor no fígado de um homem japonês de 57 anos em 1982 (NAKABAYASHI et al., 1982). Os tratamentos *in vitro* não são viáveis com o uso de triacilgliceróis como a TB, TC ou EST (ORTEGA et al., 2016). Por isso, aqui foram utilizados butirato de sódio (NaBu) (Sigma Aldrich, EUA), caprilato de sódio (NaCa) (Sigma Aldrich, EUA) e a associação dos dois, visando-se mimetizar os EST.

3.11.1 Determinação do IC50

O IC50 representa a concentração na qual uma substância exerce metade do seu efeito inibitório máximo, ou seja, a concentração inibitória na qual 50% das células encontram-se inviáveis após o tratamento com dada substância. As células THLE5B e Huh7 foram tratadas com NaBu ou NaCa em diferentes concentrações (0-128 mmol/L) por 72 h. A viabilidade celular foi determinada pelo reagente WST-1 (Roche, Alemanha). Basicamente, 5000 células THLE5B ou Huh7 tratadas com DMEM com 5% de soro fetal bovino foram transferidas para cada poço de uma placa de fundo cônico com 96 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com diferentes concentrações de NaBu ou NaCa durante 72h. Após esse período, o tratamento foi desprezado e as células receberam o reagente WST-1 que forma sais de tretazólio. A redução destes sais por desidrogenases ou redutases produzem compostos cromogênicos que foram quantificados em leitor de microplacas

(Tecan, Infinite M200Pro, Suíça), 30 min, 60 min, 90 min e 120 min após o início da reação (CZAUDERNA et al., 2018). Os experimentos foram realizados em três replicatas independentes e os resultados foram analisados com o software Prisma (EUA).

3.11.2 Status redox celular

O clormetil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (CM-H2DCFDA, Life Technologies, Invitrogen) é usado como um indicador celular permeável para ROS (RASTOGI et al., 2010). Em resumo, 5000 células THLE5B ou Huh7 tratadas com DMEM com 5% de soro fetal bovino foram transferidas para cada poço de uma microplaca branca para luminescência com 96 poços e após 24h de incubação, tratadas por 72h com NaBu e NaCa nas concentrações correspondentes ao IC50, e com a associação NaBu IC50 + NaCa IC25. A concentração da associação foi escolhida para simular a quantidade de ácido butírico e caprílico presente nos lipídios estruturados obtidos a partir da TB e da TC, uma vez que na produção dos lipídios a proporção TB:TC utilizada foi de 2,5:1 (mol/mol). Para indução de alterações do estado redox, as linhagens celulares foram tratadas por 20 minutos a 37°C com a menor concentração de H₂O₂ necessária para um aumento da intensidade de fluorescência média (Huh7: 250µM, THLE5B: 250µM). As alterações do status redox foram avaliadas incubando células com CM-H2DCF-DA (DCF) 5µmol/L por 45 minutos, de acordo com Czauderna e colaboradores (CZAUDERNA et al., 2018). Após a incubação, as células foram imediatamente estocadas em gelo. A fluorescência foi quantificada em leitor de microplacas (Tecan, Infinite M200Pro, Suíça), com excitação de 492 nm e emissão de 527 nm. Todos os experimentos foram realizados em três repetições independentes.

3.12 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (Brown-Forsythe). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e todas as análises estatísticas foram realizadas

utilizando-se o programa Prisma (EUA) e adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Na constatação de que foram satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de comparação de médias de amostras independentes, as análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey. Nos casos em que a distribuição dos dados não foi normal, foram realizados testes não paramétricos como o teste Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Dunn.

4 Resultados

4.1 Caracterização dos EST

A **Figura 6** representa a composição em triacilgliceróis da TB, TC e EST obtida por cromatografia líquida de alta eficiência. Assim, neste estudo, como esperado, TB apresentou 96,2% de BBB (B=4:0) enquanto TC apresentou 96,9% de CCC (C=8:0). Os valores não atingiram 100% devido ao grau de pureza da TB e da TC utilizadas. O perfil de triacilgliceróis dos EST permite identificar a nova composição formada pela reação de interesterificação enzimática. Novos triacilgliceróis foram sintetizados com 16 e 20 átomos de carbono que não estavam presentes na TB e na TC. As três moléculas de B que estavam presentes inicialmente na TB foram redistribuídas juntamente com os ácidos graxos provenientes da TC, para formar novos triacilgliceróis como BBC/BCB e BCC/CBC. Aproximadamente 42% dos triacilgliceróis presentes nos EST apresentaram 2 B em sua estrutura.

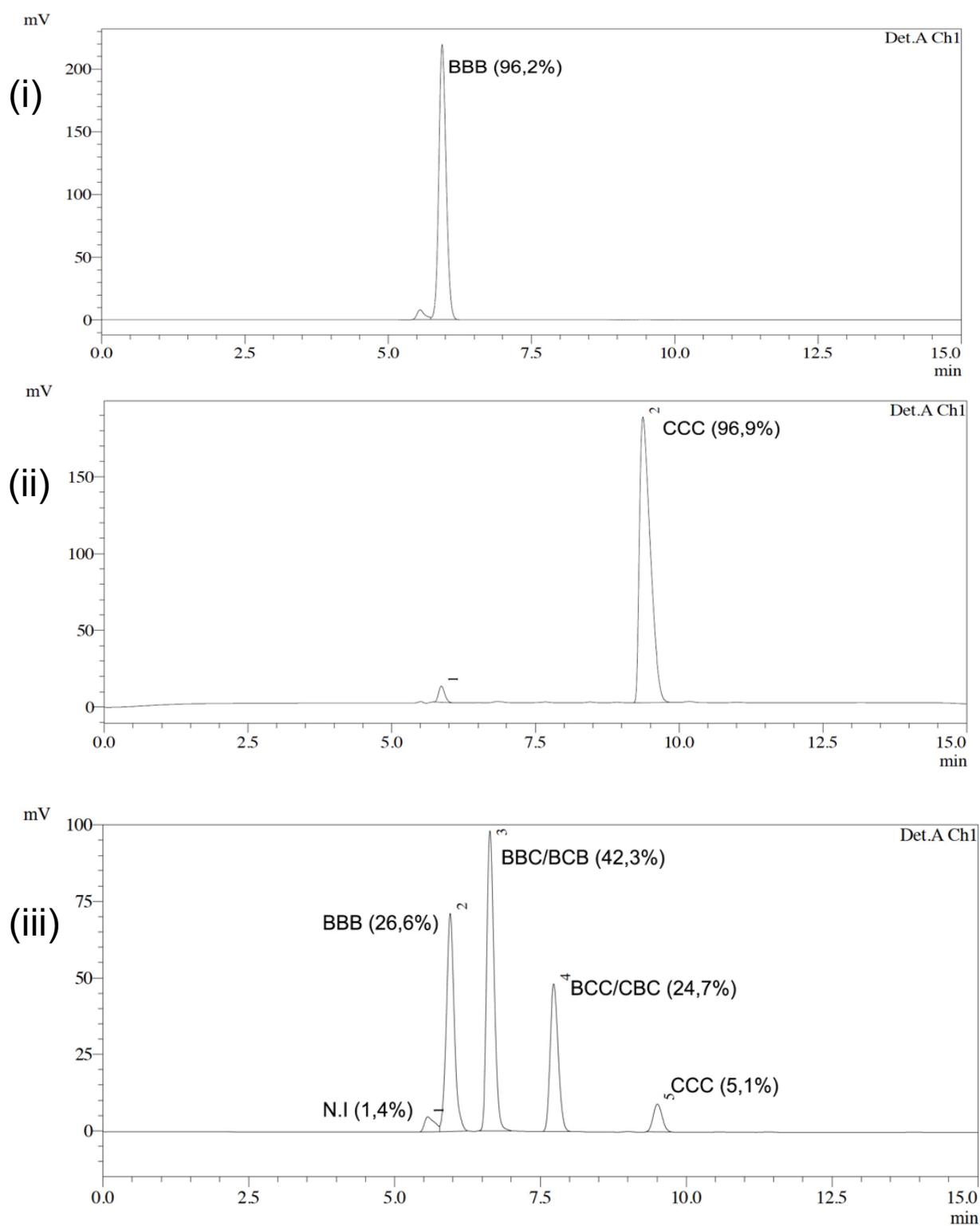


Figura 6. Cromatogramas representativos da composição em triacilgliceróis da tributirina (i), tricaprilina (ii) e lipídios estruturados (iii). B=4:0 – ácido butírico e C=8:0 – ácido caprílico.

4.2 Ensaio biológico

4.2.1 Modelo do RH - evolução do peso corporal

O acompanhamento da evolução do peso corporal teve como objetivo avaliar possíveis efeitos tóxicos das substâncias administradas, além da aplicação adequada do modelo do RH. Na **Figura 7**, observa-se queda na média do peso corporal dos animais dos grupos tratados após a administração da DEN, de 2-AAF e do procedimento de hepatectomia parcial (70%), como esperado. A evolução do peso se manteve semelhante em todos os grupos.

Houve 37,28 % de mortalidade dos animais, acima do esperado (15-20%) pela experiência do nosso grupo. As causas da elevada mortalidade podem estar relacionadas à utilização de ratos Fisher, que são mais susceptíveis do que ratos Wistar a carcinógenos e à dosagem de 2-acetilaminofluoreno utilizada no experimento.

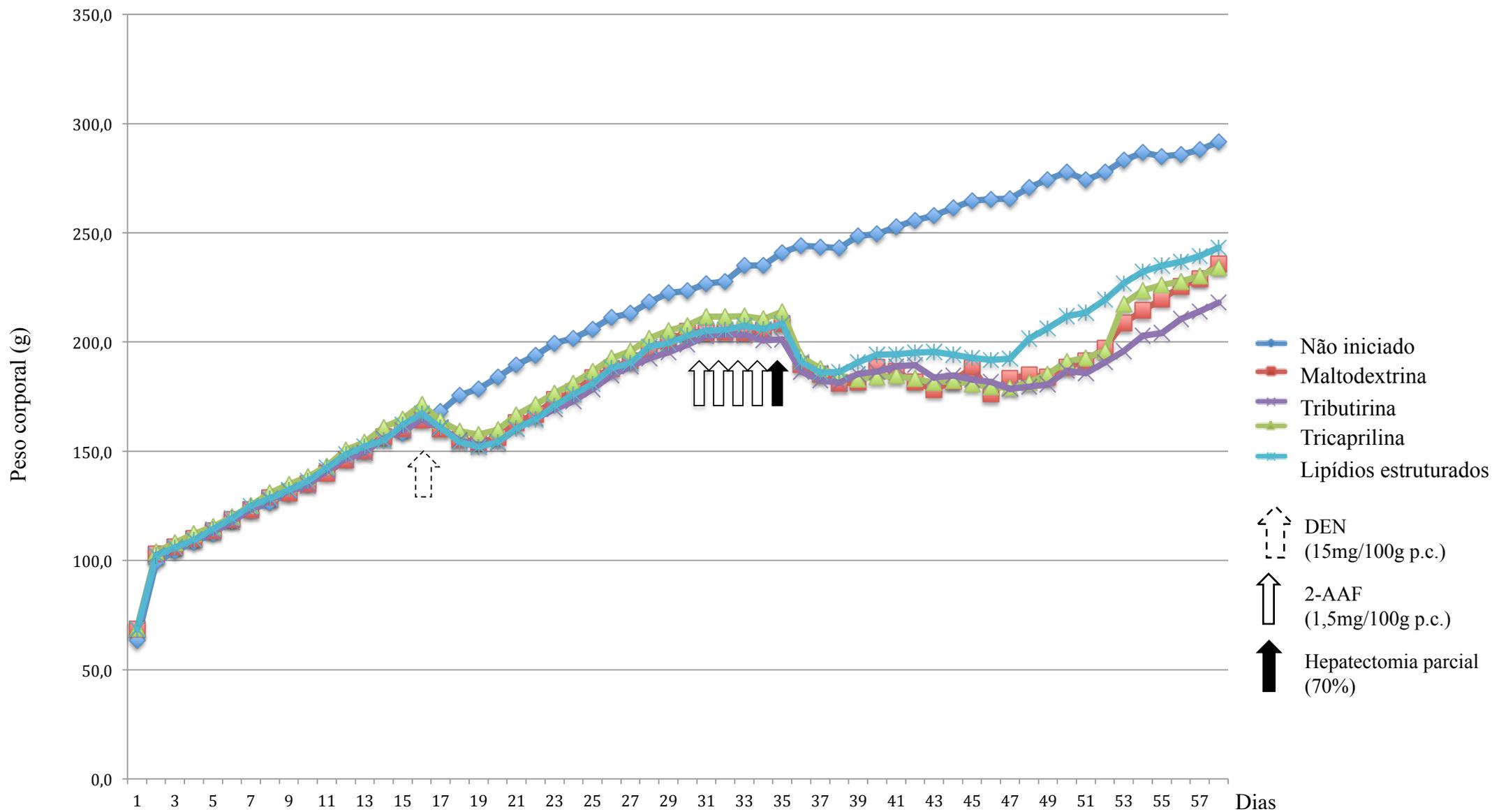


Figura 7. Evolução do peso corporal dos animais do grupo não iniciado, bem como dos submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente e tratados com maltodextrina, tributirina, tricaprilina ou lipídios estruturados durante as 8 semanas de experimento. *DEN*: dietilnitrosamina; *2-AAF*: 2-acetilaminofluoreno.

4.2.2 Exame macroscópico do fígado

Não houve diferença relativa ao peso corporal inicial e final entre os grupos ($p > 0,05$) (**Tabela 1**). No que diz respeito ao peso hepático relativo, também não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$). Além disso, todos os grupos tratados apresentaram nódulos macroscópicos (incidência de 100%). O número médio de nódulos no fígado dos animais tratados com TC foi 54,9% menor em comparação ao encontrado no tecido hepático dos ratos que receberam MD, sem atingir, entretanto, significância estatística. Por outro lado, o número médio de nódulos hepáticos no grupo TB foi menor ($p < 0,05$) em comparação ao grupo MD. O tratamento com EST também reduziu ($p < 0,05$) o número médio de nódulos quando comparado ao controle MD.

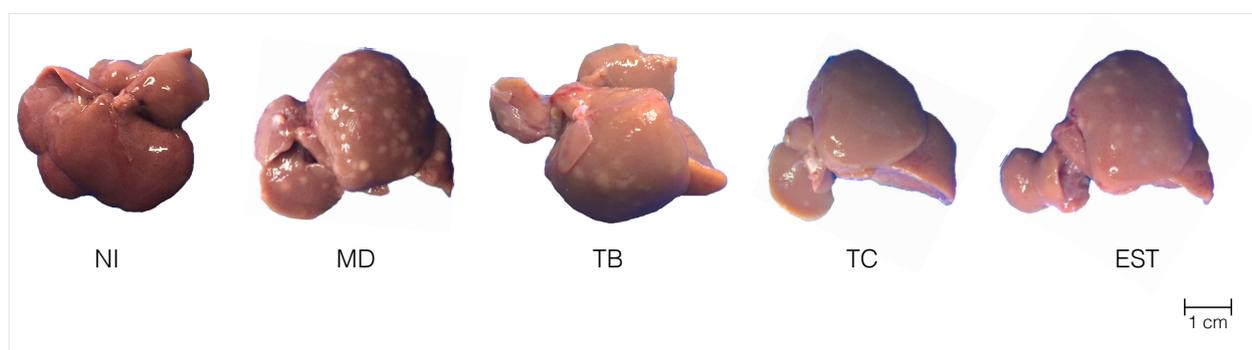


Figura 8. Imagem representativa do aspecto macroscópico dos fígados dos animais do grupo não iniciado (NI), bem como dos submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Tabela 1. Peso corporal inicial e final, bem como peso hepático relativo, incidência de nódulos e seu número médio dos animais submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção da hepatocarcinogênese.

Grupos (n)	Peso Corporal Inicial (g)	Peso Corporal Final (g)	Peso Hepático Relativo (g)	Incidência de nódulos (%)	Número médio de nódulos macroscópicos
MD (7)	105,0 ± 7,4	244,8 ± 20,3	4,0 ± 0,5	100	168,3 ± 62,5
TB (7)	104,5 ± 4,3	220,2 ± 12,9	3,6 ± 0,7	100	49,4 ± 7,7 [#]
TC (10)	100,8 ± 3,1	210,7 ± 16,6	3,7 ± 0,2	100	75,9 ± 39,1
EST (9)	104,0 ± 2,4	244,0 ± 19,3	3,7 ± 0,3	100	70,7 ± 35,0 [#]

Dados expressos na forma de média ± desvio padrão; [#]Diferença em relação ao grupo MD segundo teste ANOVA seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey; p<0,05.

4.3 Análise morfométrica: avaliação de pLPN e rLPN GST-P positivas

No que diz respeito à análise morfométrica (**Tabela 2**), o número médio de lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN) por cm² no grupo TB foi menor (p < 0,05) em comparação ao grupo MD. O tratamento com EST também reduziu (p < 0,05) o número médio de pLPN por cm² em comparação à administração da maltodextrina (Grupo MD, controle isocalórico). Em relação ao número médio de lesões pré-neoplásicas em remodelação (rLPN) por cm², não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Da mesma forma, tratando-se do tamanho das pLPN por mm², não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Por outro lado, no que diz respeito ao tamanho médio das rLPN por mm², o tratamento com TC aumentou (p < 0,05) a área destas em comparação às lesões observadas no tecido hepático dos ratos que receberam MD (controle isocalórico).

Observou-se redução na porcentagem de área hepática ocupada pelas pLPN em relação ao grupo MD nos grupos TC (43,3%) e EST (46,5%). A diferença, entretanto, não atingiu significância estatística. O tratamento com TC resultou em um aumento de 2,2 vezes na porcentagem da área ocupada por rLPN. Resultados semelhantes foram observados nos grupos TB (aumento de 2,0 vezes) e EST (aumento de 3,2 vezes).

Tabela 2. Análise morfométrica pela marcação com GST-P, demonstrando número de lesões preneoplásicas persistentes (pLPN) e em remodelação (rLPN) por cm², tamanho médio das mesmas (mm²) e porcentagem da área dos cortes hepáticos ocupados por pLPN e rLPN em animais submetidos ao modelo do RH e tratados continuamente com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Grupos (n)	Análise morfométrica de LPNs GST-P-positivas					
	Nº de LPN GST-P ⁺ /cm ²		Tamanho das LPN GST-P ⁺ (mm ²)		Área do corte ocupada por LPN GST-P ⁺ (%)	
	pLPN	rLPN	pLPN	rLPN	pLPN	rLPN
MD (7)	24,7 ± 8,2	26,0 ± 9,7	1,0 ± 0,6	0,1 ± 0,08	24,5 ± 12,9	3,3 ± 1,6
TB (7)	16,9 ± 8,0	21,7 ± 15,2	1,1 ± 0,5	0,4 ± 0,4	16,5 ± 6,4	6,7 ± 5,0
TC (10)	14,4 ± 7,2 [#]	18,9 ± 10,6	0,9 ± 0,3	0,4 ± 0,3 ^{&}	13,9 ± 9,6	7,3 ± 4,6
EST (9)	14,5 ± 6,7 [#]	21,9 ± 7,8	0,9 ± 0,3	0,6 ± 0,7	13,1 ± 8,1	10,5 ± 9,8

Dados expressos na forma de média ± desvio padrão. p = persistente; r = remodelação. Teste Shapiro-Wilk de normalidade, [#]Diferença em relação ao grupo MD, de acordo com teste ANOVA seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey, p<0,05; [&]Diferença em relação ao grupo MD, de acordo com teste Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Dunn, p<0,05.

4.4 Avaliação da proliferação celular

No que diz respeito à proliferação celular, os grupos tratados com MD, TC e EST apresentaram maior ($p < 0,05$) porcentagem de núcleos marcados para PCNA tanto nas pLPN, como nas rLPN, em comparação ao surrounding do respectivo grupo (**Tabela 3 e Figura 9**). Por outro lado, no grupo TB, não houve diferença significativa na porcentagem de núcleos marcados para PCNA nas pLPN e rLPN em comparação ao surrounding do mesmo grupo, apesar dessa porcentagem ter sido 2,1 e 1,9 vezes maior nas pLPN e nas rLPN, respectivamente.

Os grupos tratados com TB, TC e EST apresentaram menor ($p < 0,05$) porcentagem de núcleos marcados para PCNA em comparação aos controles isocalóricos tratados com MD tanto nas pLPN, como nas rLPN.

Tabela 3. Avaliação do índice de proliferação (porcentagem de núcleos marcados com PCNA) em lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

<i>Grupos (n)</i>	Índice de proliferação (% de núcleos marcados com PCNA)		
	<i>Surrounding</i>	<i>pLPN</i>	<i>rLPN</i>
MD (7)	2,6 ± 1,0	8,5 ± 1,3 [#]	7,4 ± 1,1 [#]
TB (7)	1,9 ± 1,6	4,1 ± 1,3 [*]	3,7 ± 2,1 [*]
TC (10)	0,9 ± 0,7	2,9 ± 1,2 ^{**}	2,4 ± 1,0 ^{**}
EST (9)	0,9 ± 0,4	2,5 ± 1,5 ^{**}	3,1 ± 1,1 ^{**}

Dados expressos na forma de média ± desvio padrão; [#]Diferença em relação ao surrounding no mesmo grupo; ^{}Diferença em relação ao grupo MD, de acordo com teste ANOVA seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey; $p < 0,05$.*

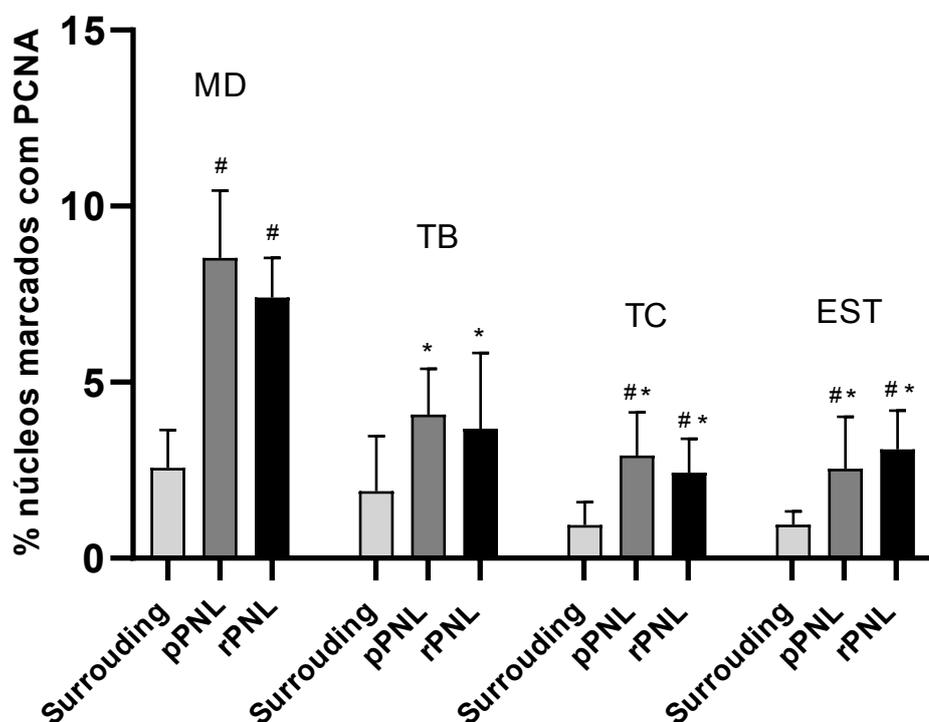


Figura 9. Avaliação do índice de proliferação (porcentagem de núcleos marcados com PCNA), em lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese. *Normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk; #Diferença em relação ao surrounding no mesmo grupo; *Diferença em relação ao grupo MD, de acordo com teste ANOVA seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey; $p < 0,05$.*

4.5 Avaliação da apoptose

No que diz respeito à apoptose, os grupos tratados com MD, TB, TC e EST apresentaram maior ($p < 0,05$) porcentagem de corpúsculos apoptóticos em comparação ao surrounding do respectivo grupo tanto em pLPN, como nas rLPN (**Tabela 4** e **Figura 10**). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação a porcentagem de corpúsculos apoptóticos nas pLPN nem nas rLPN.

Tabela 4. Avaliação do índice apoptótico (porcentagem de corpúsculos apoptóticos), em lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Grupos (n)	Índice apoptótico (% de corpúsculos apoptóticos)		
	Surrounding	pLPN	rLPN
MD (7)	0,10 ± 0,06	0,95 ± 0,83 [#]	0,78 ± 0,52 [#]
TB (7)	0,19 ± 0,13	1,27 ± 1,38 [#]	1,18 ± 0,63 [#]
TC (10)	0,14 ± 0,17	1,22 ± 0,56 [#]	0,59 ± 0,53 [#]
EST (9)	0,13 ± 0,07	1,32 ± 1,28 [#]	1,90 ± 1,65 [#]

Dados expressos na forma de média ± desvio padrão; [#]Diferença em relação ao surrounding no mesmo grupo, de acordo com teste ANOVA seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey; $p < 0,05$.

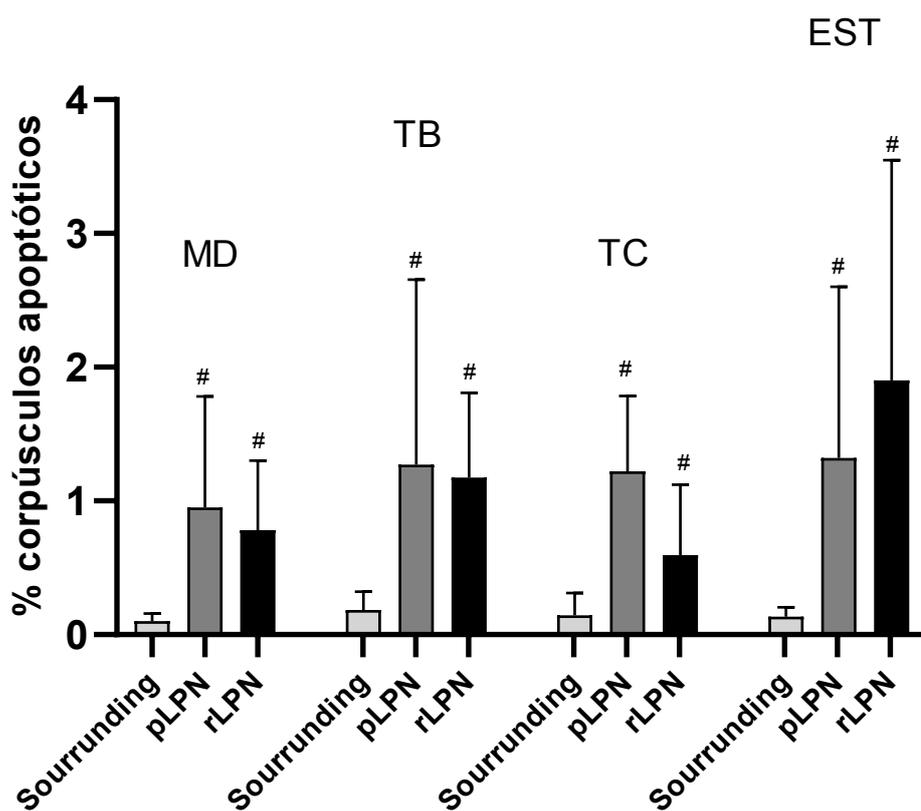


Figura 10. Avaliação do índice apoptótico (porcentagem de corpúsculos apoptóticos), em lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese. *Normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk,; #Diferença em relação ao surrounding no mesmo grupo, de acordo com teste ANOVA seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey; $p < 0,05$.*

4.6 Avaliação do índice de crescimento ajustado

Conforme a **Tabela 5**, os resultados do ICA foram maiores que 1 em todos os grupos submetidos ao modelo do RH e tratados com MD, TB, TC ou EST, tanto no surrounding quanto nas pLPN e rLPN, indicando o predomínio da proliferação celular em relação à apoptose.

Em relação ao ICA no surrounding, os grupos TB, TC e EST apresentaram menor ICA ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo do controle isocalórico MD, indicando que nestes grupos, embora ainda haja um predomínio da proliferação celular em relação a apoptose, esta vantagem é menor em comparação ao grupo MD. O grupo EST apresentou menores ICAs ($p < 0,05$) tanto nas pLPN quanto nas rLPN em comparação ao surrounding do mesmo grupo. O grupo tratado com EST também apresentou menores ICAs ($p < 0,05$) tanto nas pLPN quanto nas rLPN em comparação ao grupo MD. Além disso, o grupo EST apresentou os ICAs mais próximos de 1, tanto em pLPN, quanto em rLPN,

Tabela 5. Avaliação do índice de crescimento ajustado (razão índice de proliferação / índice apoptótico), em lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricaprilina (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese.

Grupos (n)	Índice de crescimento ajustado		
	Surrounding	pLPN	rLPN
MD (7)	22,94 ± 12,33	8,88 ± 4,56	14,52 ± 9,56
TB (7)	8,52 ± 7,06*	4,84 ± 4,70	5,60 ± 6,25
TC (10)	5,15 ± 1,93*	3,49 ± 3,96	8,86 ± 9,76
EST (9)	7,14 ± 3,27*	1,81 ± 0,84**	2,29 ± 1,76**

*Dados expressos na forma de média ± desvio padrão; #Diferença em relação ao surrounding no mesmo grupo; *Diferença em relação ao grupo MD, de acordo com teste ANOVA seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey; p<0,05.*

4.7 Determinação das concentrações hepáticas de ácido butírico e caprílico

Foram determinadas as concentrações de AB e AC no fígado dos animais dos grupos MD, TB, TC e EST por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas. Os grupos tratados com TB e EST apresentaram maiores ($p < 0,05$) concentrações de AB por grama de tecido hepático em relação ao grupo MD (**Figura 11 i**). Em contrapartida, os grupos MD e TC, que não receberam tratamentos com AB na composição, apresentaram concentrações detectáveis de AB. O grupo tratado com TC apresentou, ainda, maiores ($p < 0,05$) concentrações de AB por grama de tecido hepático em relação ao grupo MD.

Como esperado, os grupos TC e EST apresentaram maiores ($p < 0,05$) concentrações de AC por grama de tecido hepático em relação ao controle MD (**Figura 11 ii**). Além disso, o grupo TC apresentou maiores ($p < 0,05$) concentrações de AC por grama de tecido hepático em relação aos grupos EST e TB.

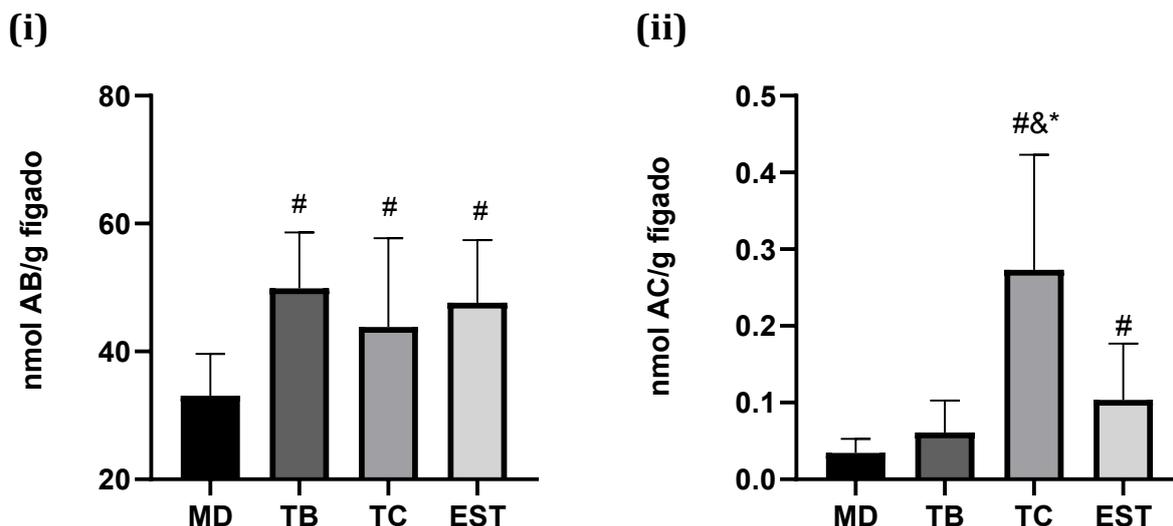


Figura 11. Concentrações hepáticas de ácido butírico (AB) **(i)** e ácido caprílico (AC) **(ii)** do tecido hepático de ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tricaprilina (TC), tributirina (TB) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese. *Normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk, teste ANOVA seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey. # diferença em relação ao grupo MD; & diferença em relação ao grupo TB; * diferença em relação ao grupo EST; $p < 0,05$.*

4.8 Avaliação do dano no DNA

Os animais dos grupos TB, TC e EST apresentaram cometas de comprimentos menores ($p < 0,05$), quando comparados aos animais do grupo controle MD (**Figura 12 i**). Além disso, o western blot da histona γ H2AX, proteína diretamente relacionada à quebra de fita dupla do DNA, mostrou menores níveis de γ H2AX ($p < 0,05$) nos grupos tratados com TB e EST em relação ao grupo controle MD, conforme observado na **Figura 12 ii**.

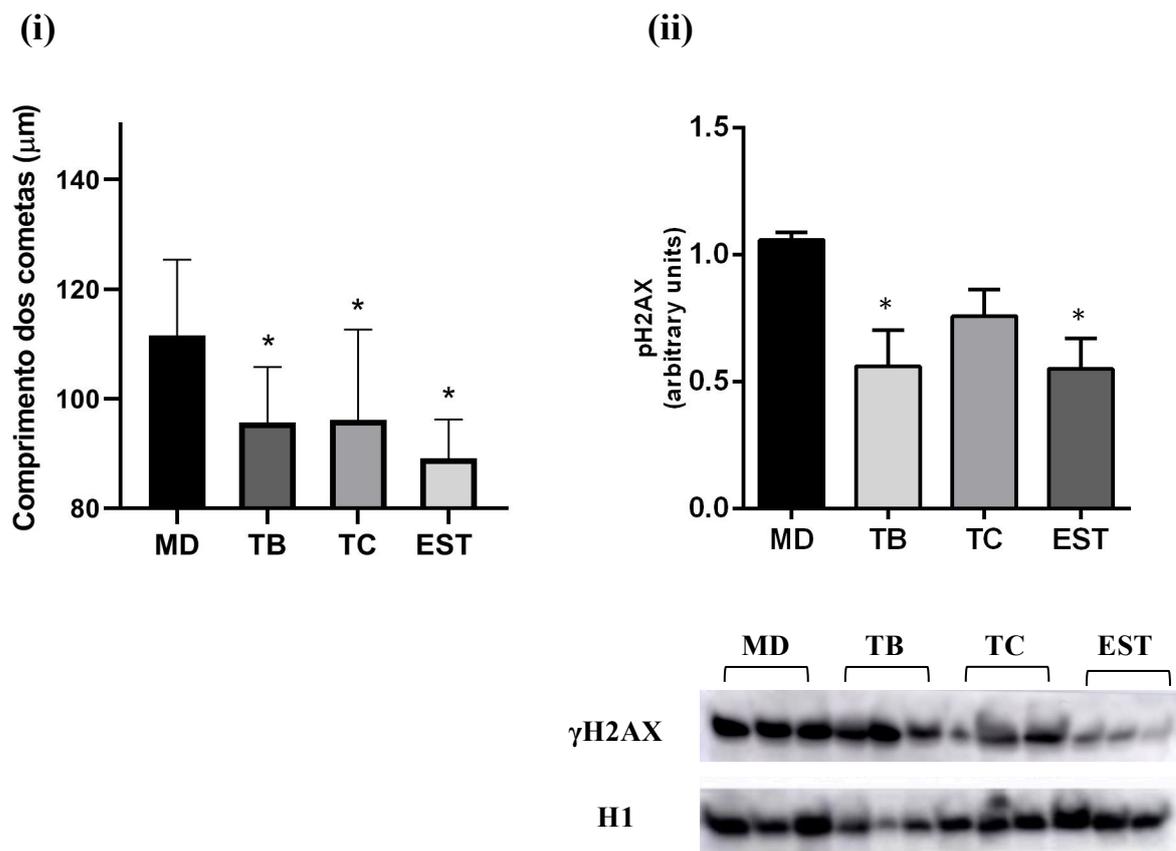


Figura 12. Avaliação do dano no DNA. **(i)** Média do comprimento dos cometas em μm dos fígados dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricapriline (TC) ou lipídios estruturados (EST) nas etapas de iniciação/promoção inicial da hepatocarcinogênese. Normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk, teste ANOVA seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey; * diferença em relação ao grupo MD; $p < 0,05$. **(ii)** Análise dos níveis da histona H2AX fosforilada (γH2AX) no fígado de ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tributirina (TB), tricapriline (TC) ou lipídios estruturados (EST) durante as fases de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese. Os resultados são mostrados como fold change em relação ao grupo controle MD, que recebeu o valor 1 ($n = 3$). *Significativamente diferente do grupo MD identificado pelo teste ANOVA seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey.

4.9 Sequenciamento do RNA

A **Figura 13 i** representa a análise hierárquica de cluster de genes diferencialmente expressos em tecido hepático de ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com MD, TB, TC ou EST. Amostras de fígado de animais não submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese (Normais) também foram analisadas. É possível observar semelhanças entre o padrão de genes diferencialmente expressos nos grupos EST e Normal, sugerindo que o tratamento com EST contribuiu para a volta ao estado de “normalidade“ dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com esses lipídios. De maneira contrária, é possível observar um padrão oposto de expressão dos genes diferencialmente expressos nos grupos MD e EST.

A **figura 13 ii** representa o padrão de genes diferencialmente expressos apenas do grupo EST e do grupo controle MD. Aqui, é possível observar claramente um agrupamento entre os genes *upregulated* (em vermelho) e *downregulated* (em azul) e o modo como a expressão desses genes se comporta de forma oposta nestes dois grupos. Em outra perspectiva, a análise de componentes principais representada na **figura 14** indica um distanciamento substancial entre as amostras do grupo EST e as do controle MD.

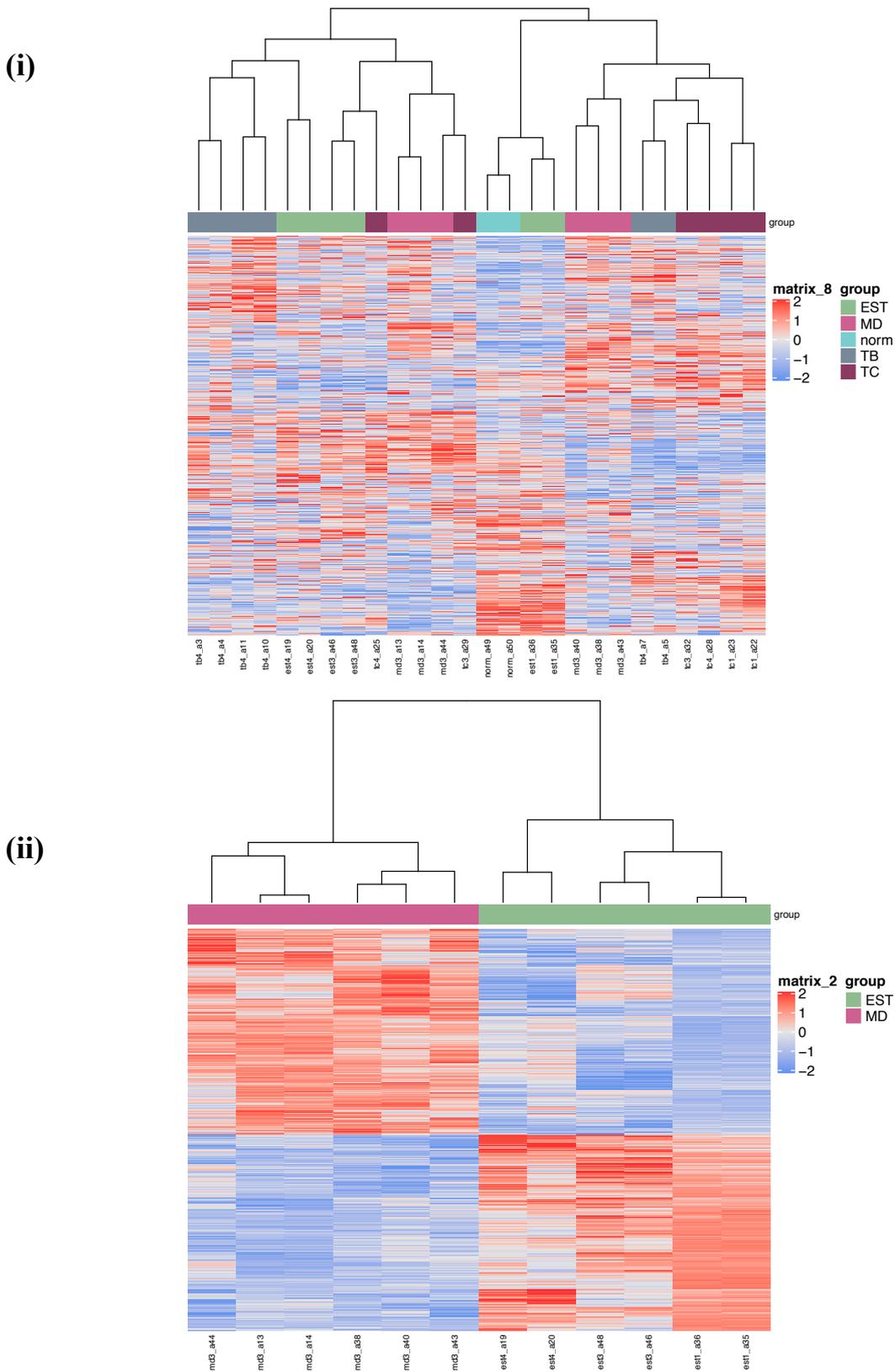


Figura 13. Mapa de calor, ou *Heatmap*, ilustrando as diferenças globais na expressão gênica entre ratos **(i)** não submetidos ao modelo do RH (norm) e animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD), tricaprilina (TC), tributirina (TB) ou lipídios estruturados (EST); **(ii)** animais submetidos ao modelo do RH e

tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST). As cores indicam genes com aumento (vermelho) ou redução (azul) da expressão. Foram analisadas amostras de RNA de 3 animais por grupo experimental. $P < 0,05$.

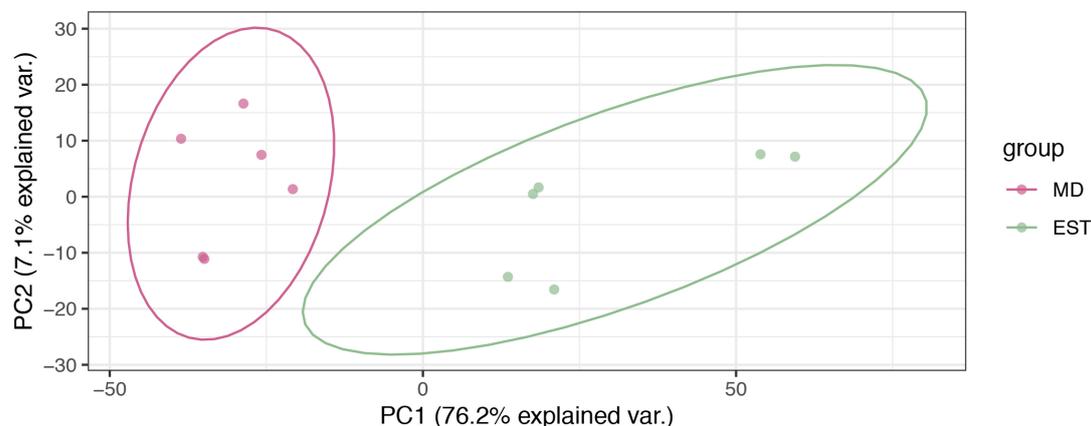


Figura 14. Análise de componentes principais que ilustra a compartimentalização entre os grupos de animais tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) e submetidos ao modelo do RH. Foram analisadas amostras de RNA de 3 animais por grupo experimental. $P < 0,05$.

4.9.1 Identificação de vias canônicas e análise de enriquecimento GSEA

A fim de obter uma visão biológica das mudanças de expressão observadas, os dados do microarray dos grupos MD e EST foram submetidos à análise *IPA Core*. Os genes diferencialmente expressos foram categorizados em vias canônicas, conforme apresentado na **figura 15**, na qual estão sinalizadas as principais categorias enriquecidas de vias canônicas com um valor de p menor que 0,001, bem como genes diferencialmente expressos representativos em cada via. Nesta análise destaca-se a via do NRF2 mediada por estresse oxidativo, que é a segunda mais enriquecida, ou seja, trata-se de uma via biológica enriquecida em uma lista de genes mais do que seria esperado por acaso.

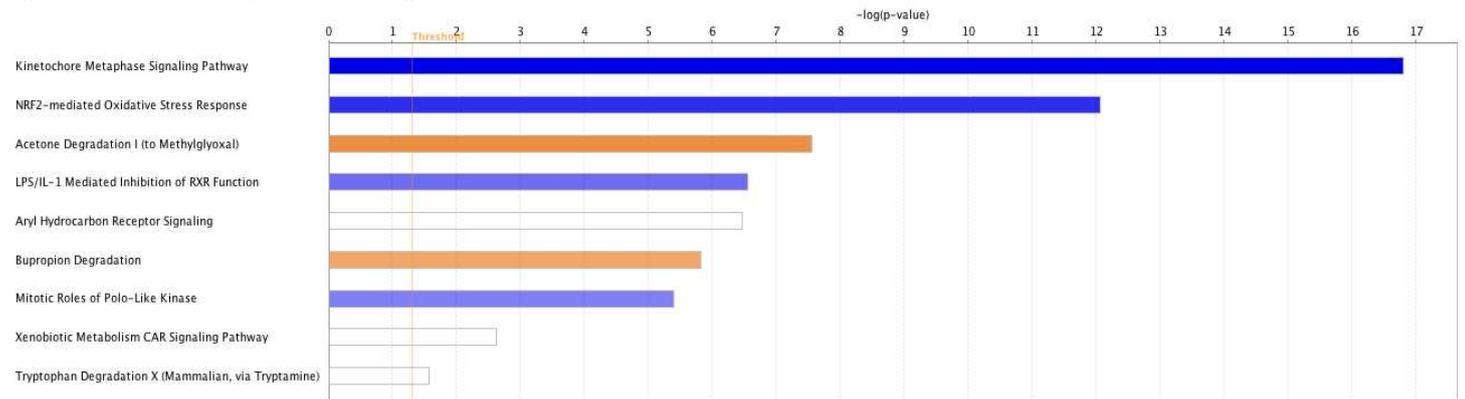
Consistentemente com a análise de vias canônicas, os resultados obtidos pelo GSEA mostraram enriquecimento para o gene NRF2 (**figura 16 i**) e para a via das

espécies reativas de oxigênio (**figura 16 ii**) no grupo EST quando comparado ao grupo MD. O resultado primário da análise de enriquecimento do conjunto de genes é a pontuação de enriquecimento, ou *enrichment score* (ES), que reflete o grau em que um conjunto de genes é representado na parte superior ou inferior de uma lista classificada de genes. O GSEA calcula o ES percorrendo a lista classificada de genes e a magnitude do incremento depende da correlação do gene com o fenótipo. O ES é o desvio máximo de zero encontrado ao percorrer a lista. Um ES positivo indica o enriquecimento do conjunto de genes no topo da lista de classificação; um ES negativo indica o enriquecimento do conjunto de genes na parte inferior da lista classificada. A parte superior do gráfico mostra o ES em execução para o conjunto de genes à medida que a análise percorre a lista classificada. A pontuação no pico do gráfico (a pontuação mais distante de 0,0) é o ES para o conjunto de genes. Nesse caso, tanto a **figura 16 i** quando a **figura 16 ii** mostram um ES positivo, de 0,6786082 na primeira, e 0,44900134 na segunda. Conjuntos de genes com um pico distinto no início (como o mostrado nas **figuras 16 i e ii**) ou no final da lista classificada são frequentemente os de maior interesse (GSEA User guide disponível em <https://www.gseamsigdb.org/gsea>).

A taxa de falsa descoberta (FDR) é a probabilidade estimada de que um conjunto de genes com um determinado ES represente um achado falso positivo. Por exemplo, um FDR de 25%, ou 0,25, indica que o resultado provavelmente será válido em 3 de 4 vezes. Em geral, conjuntos de genes de enriquecimento com um FDR inferior a 0,25 são entendidos como aqueles com maior probabilidade de gerar hipóteses interessantes e impulsionar pesquisas adicionais. Neste caso, as **figuras 16 i e ii** apontam um FDR de 0,036 e 0,172, respectivamente.

Analysis: Wald EST 0.1 2021-10-05 12:03 nachm.

■ positive z-score □ z-score = 0 ■ negative z-score ■ no activity pattern available



© 2000-2021 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 15. Identificação de vias canônicas. Os genes diferencialmente expressos foram categorizados em vias canônicas pelo software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). O Z-score indica se esta via de sinalização específica está ativada ou inibida. As vias ativadas têm pontuação positiva e estão coradas em laranja, enquanto as vias inibidas têm pontuação negativa e estão apresentadas em azul. A cor cinza indica que a função não pôde ser prevista.

(i)

Table: GSEA Results Summary

Dataset	rlog dots ensembl_collapsed_to_symbols. EST_vs_MD.cis #EST_vs_MD. EST_vs_MD.cis #EST_vs_MD_repos
Phenotype	EST_vs_MD.cis#EST_vs_MD_repos
Upregulated in class	EST
GeneSet	WP_NRF2ARE_REGULATION
Enrichment Score (ES)	0.6786082
Normalized Enrichment Score (NES)	1.9995413
Nominal p-value	0.0
FDR q-value	0.036707822
FWER p-Value	0.19

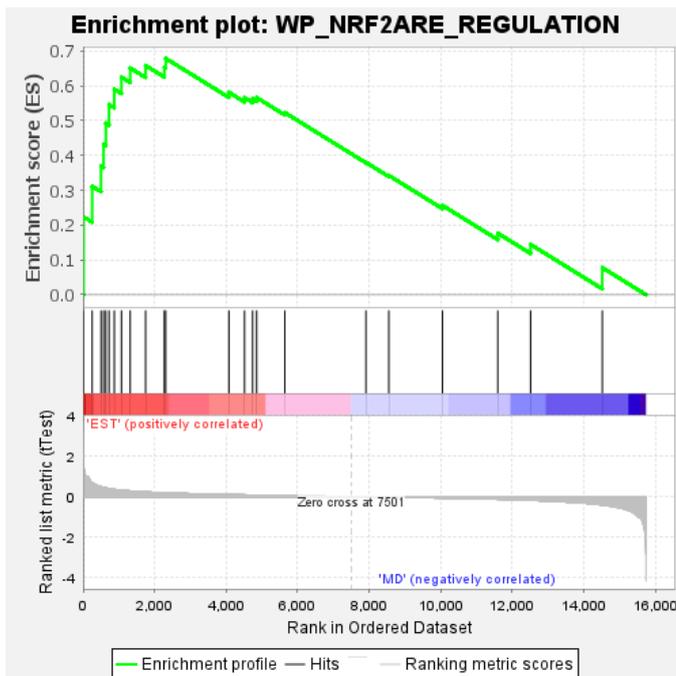
**(ii)**

Table: GSEA Results Summary

Dataset	rlog dots ensembl_collapsed_to_symbols. EST_vs_MD.cis #EST_vs_MD. EST_vs_MD.cis #EST_vs_MD_repos
Phenotype	EST_vs_MD.cis#EST_vs_MD_repos
Upregulated in class	EST
GeneSet	HALLMARK_REACTIVE_OXYGEN_SPECIES_PATHWAY
Enrichment Score (ES)	0.44900134
Normalized Enrichment Score (NES)	1.4075928
Nominal p-value	0.071428575
FDR q-value	0.17223759
FWER p-Value	0.2

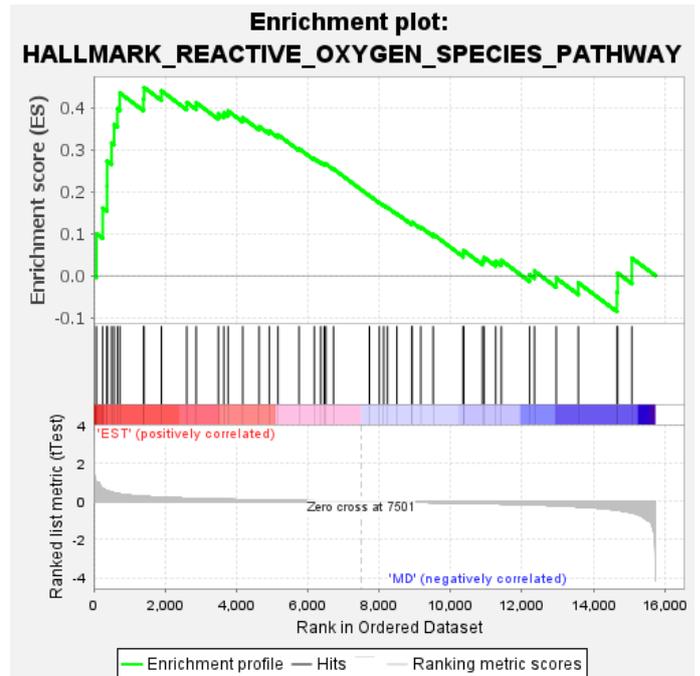


Figura 16. Análise de enriquecimento de conjuntos de genes obtida por GSEA evidenciando enriquecimento para **(i)** o gene NRF2 e **(ii)** para a via das espécies reativas de oxigênio no grupo EST quando comparado ao grupo MD. *n* de 3 amostras por grupo experimental.

4.10 Ensaio *in vitro*

4.10.1 Determinação do IC50

Os dados do sequenciamento apontaram para uma possível modulação da via do NRF2 e do estresse oxidativo após o tratamento dos animais com os lipídios estruturados. Para validar essa observação, foram realizadas análises *in vitro* com células de hepatócitos humanos (THLE5B) e células neoplásicas bem diferenciadas derivadas de hepatócitos (Huh7). Para determinar a concentração do tratamento que seria utilizado em experimentos posteriores, foi determinado o IC50 de cada célula com cada tratamento. Os valores obtidos para o IC50 foram, para as células THLE5B: NaBu = $101,22 \pm 38,43$ mM e NaCa = $10,01 \pm 0,72$ mM. Para as células Huh7, as concentrações para o IC50 obtidas foram: NaBu = $106,82 \pm 29,38$ mM e NaCa = $10,24 \pm 1,39$ mM. Na **figura 17** estão representados os gráficos de viabilidade celular para as células THLE5B e Huh7 tratadas com NaBu ou NaCa.

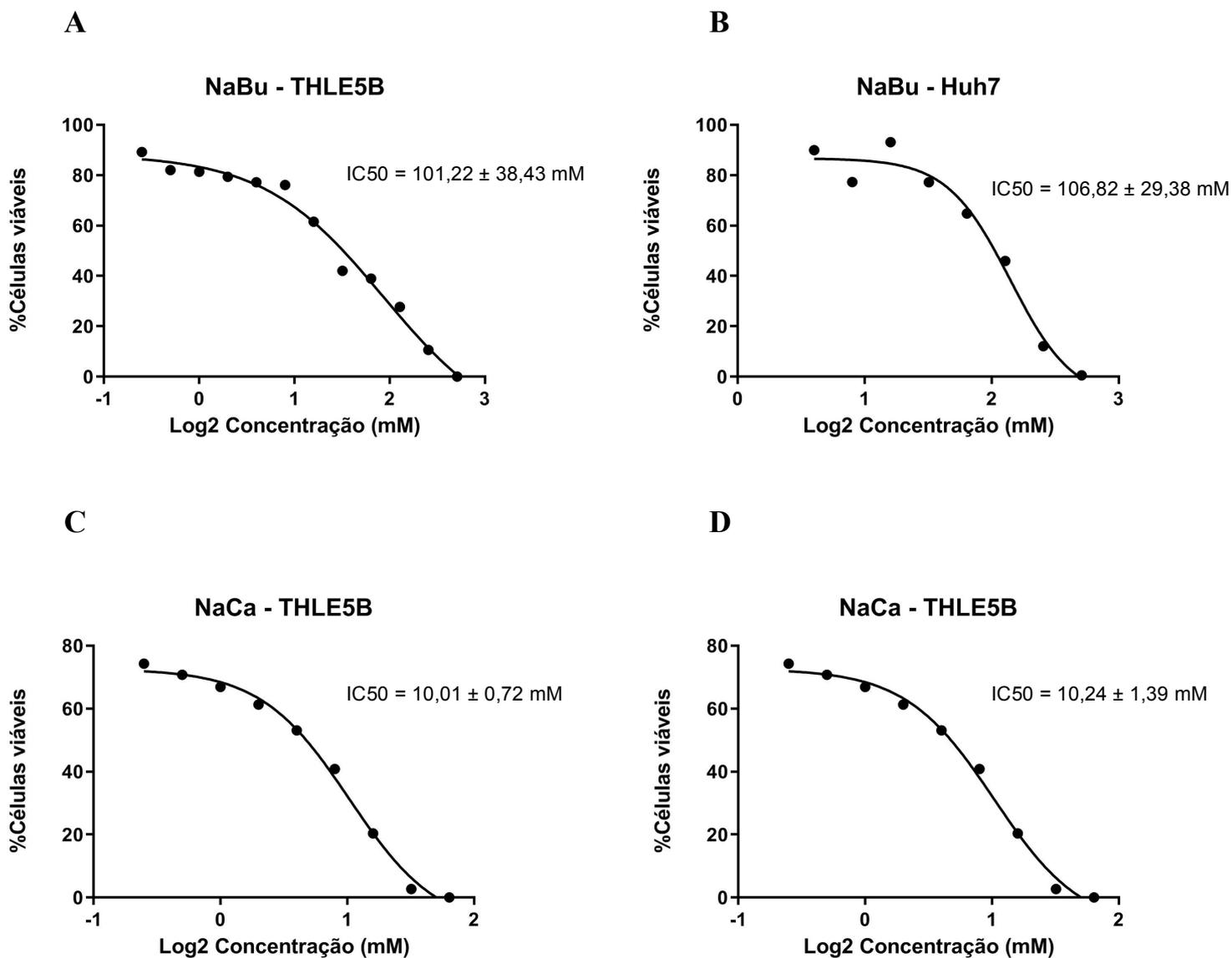


Figura 17. Valores médios de IC50 obtidos para o tratamento de células (A) THLE5B (hepatócitos humanos imortalizados) tratadas com butirato de sódio (NaBu); (B) Huh7 (células de carcinoma hepatocelular humano) tratadas com NaBu; (C) THLE5B tratadas com caprilato de sódio (NaCa); (D) Huh7 tratadas com NaCa a partir de três experimentos independentes. Dados expressos na forma de Média ± SD.

4.10.2 Status redox celular

Foram analisadas as potenciais propriedades antioxidantes do NaBu, NaCa e EST, o qual foi mimetizado por uma mistura de NaBu na concentração referente ao IC50 e NaCa na concentração referente ao IC25, em linhagem de células de hepatócitos humanos normais imortalizados, THLE5B, e na de células de carcinoma hepatocelular humano, Huh7. Os resultados estão apresentados na **figura 18**, que mostra uma diminuição ($p < 0,05$) da fluorescência de DCF em células THLE5B tratadas com NaBu, NaCa ou EST em relação às células não tratadas. Além disso, nessa linhagem celular, os tratamentos com NaBu e EST resultaram em redução ($p < 0,05$) das intensidades de fluorescência de DCF em comparação ao tratamento com NaCa (**Figura 18A**), indicando maior atividade antioxidante do NaBu e dos EST. Nas células Huh7 é observada redução ($p < 0,05$) das intensidades de fluorescência de DCF, em relação as células não tratadas, após tratamento com NaBu, NaCa e EST (**Figura 18B**).

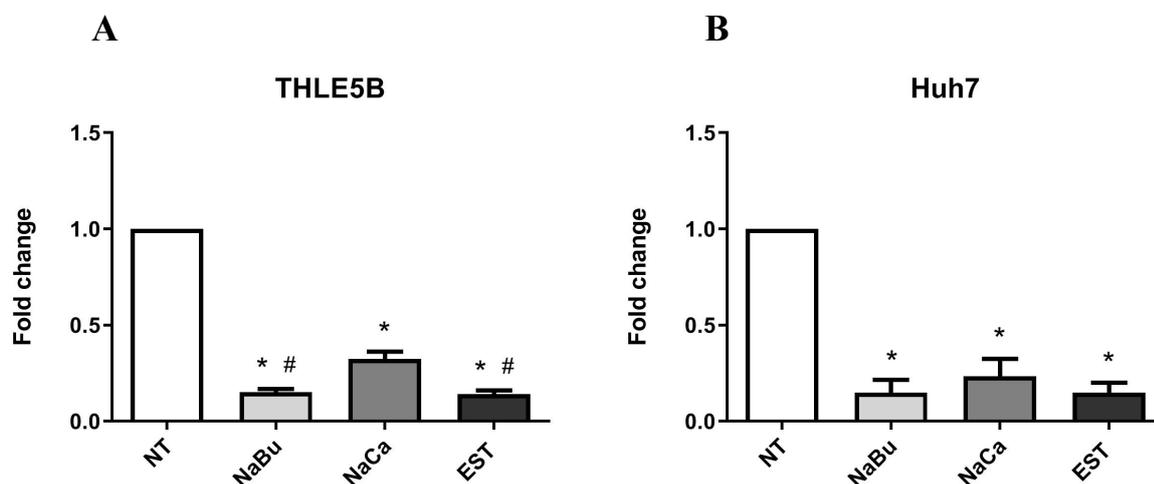


Figura 18. Atividades antioxidantes. Alterações no status redox foram avaliadas usando o indicador ROS CM-H2DCF-DA em células THLE5B (**A**) e Huh7 (**B**) não tratadas (NT) e após 72h de exposição a butirato de sódio (NaBu), caprilato de sódio (NaCa) ou combinação NaBu + NaCa mimetizando os lipídios estruturados (EST). Os dados representam *fold change* de intensidade de fluorescência em relação ao grupo não tratado de três experimentos independentes (Média \pm SD). * Diferença em relação ao grupo MD; # Diferença em relação ao grupo NaCa de acordo com teste ANOVA seguido do teste post hoc de comparações múltiplas de Tukey; $p < 0,05$.

5 Discussão

A doença hepática crônica causada por etiologias virais ou metabólicas é uma condição de alto risco para o desenvolvimento do HCC. Mesmo após o tratamento curativo da neoplasia em estágio inicial, o microambiente carcinogênico persiste no fígado remanescente e fornece suporte para o desenvolvimento de neoplasias HCC *de novo*. Portanto, a prevenção do desenvolvimento de HCC em pacientes com risco não apenas de neoplasia primária, mas também de segunda neoplasia primária de HCC é teoricamente a estratégia com maior impacto para melhorar o prognóstico do paciente (LLOVET et al., 2021).

Entre os agentes quimiopreventivos estudados para a quimioprevenção do HCC, destaca-se a tributirina, um pró-fármaco do ácido butírico. Diversos estudos demonstram a atividade quimiopreventiva da tributirina quando administrada em modelos de hepatocarcinogênese experimental. Essa substância atua aumentando as concentrações hepáticas de ácido butírico, o qual atua inibindo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas por meio da indução da apoptose, diferenciação celular (HEIDOR et al., 2012), inibição de HDAC (ORTEGA et al., 2021), translocação citoplasma/núcleo da p53 (ORTEGA et al., 2016) e efeitos antiangiogênicos (ANDRADE et al., 2019). O uso da tributirina, entretanto, é limitado devido a necessidade de elevadas doses para que a substância atinja concentrações plasmáticas satisfatórias e efetivas.

Outra molécula promissora, o ácido caprílico está presente em laticínios e também no óleo de coco e apresenta propriedades antineoplásicas *in vitro* (NARAYANAN et al., 2015). Esse ácido graxo de cadeia média é capaz de aumentar a absorção de outras moléculas, como peptídeos e fármacos pela modulação das *tight junctions* facilitando, dessa forma, a absorção de compostos pela via paracelular (AUNGST, 2011).

Dado que na carcinogênese diversas vias moleculares encontram-se alteradas, a combinação de agentes quimiopreventivos é uma estratégia interessante devido à possibilidade de ação do novo composto em um amplo espectro de mecanismos moleculares (YANG; WANG; HU, 2013). Lipídios estruturados são, nesse sentido,

uma nova geração de substâncias com potencial quimiopreventivo e até mesmo quimioterapêutico capazes de garantir efeitos de sinergia e adição, aumentar a biodisponibilidade de compostos e atuar em diversos alvos moleculares (ORTEGA et al., 2021).

Neste trabalho, EST foram obtidos a partir do processo de interesterificação enzimática da tributirina com a tricaprilina. Conforme o esperado, a caracterização dos EST demonstrou que a maior parte dos lipídios estruturados obtidos apresentou duas moléculas de ácido butírico e uma de ácido caprílico em sua estrutura, tendo como objetivo a obtenção de triacilgliceróis com potencial anticarcinogênico.

Os EST obtidos foram administrados em ratos Fischer-344 isogênicos durante as fases de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese. Para tanto, foi utilizado o modelo do RH, que é capaz de produzir LPN precursoras do HCC. Esse modelo parte do princípio de que células iniciadas, nesse caso quimicamente por meio de um agente alquilante do DNA, a DEN, não são capazes de metabolizar o agente promotor 2-AAF (BLANCK; WICKSELL; ERIKSSON, 1987). Esse composto, quando metabolizado, fornece seu metabólito tóxico que inibe a proliferação celular dos hepatócitos. Assim, após a administração do agente promotor, que seleciona os hepatócitos, apenas os iniciados são capazes de proliferar diante do estímulo mitogênico caracterizado pela hepatectomia parcial, uma vez que os hepatócitos não iniciados são capazes de metabolizar o 2-AAF e ter a proliferação celular inibida pelo metabólito tóxico desse composto (FARBER, SARMA, 1987; ROOMI, FARBER, PARKE, 1997). Ao final do experimento são observados nódulos macroscópicos, e, microscopicamente, lesões pré-neoplásicas, que podem ser classificadas em persistentes ou em remodelação (ANDERSEN et al., 2010).

A evolução do peso corporal durante todo o experimento ocorreu conforme o esperado, sugerindo correta aplicação do modelo do RH e ausência de efeitos tóxicos das substâncias administradas. A ausência de diferença relativa ao peso corporal inicial e final entre os grupos confirma a escolha da maltodextrina como um bom controle isocalórico. Além disso, os grupos tratados não apresentaram diferença em relação ao peso hepático relativo, o que demonstra a ausência de toxicidade aparente dos compostos estudados.

A presença de nódulos macroscópicos nos fígados dos animais de todos os grupos tratados do presente estudo indica que o modelo do RH foi corretamente aplicado. A redução do número médio de nódulos hepáticos observada nos grupos TB e EST em relação ao grupo controle MD confirma a ocorrência de atividade quimiopreventiva da TB observada em estudos anteriores (HEIDOR et al., 2016; ANDRADE et al., 2019) e evidencia o potencial quimiopreventivo dos EST aqui obtidos, de forma semelhante ao observado em estudo no qual ratos Wistar foram tratados continuamente com EST derivados da TB e do óleo de linhaça durante as fases de iniciação e promoção inicial da hepatocarcinogênese (HEIDOR et al., 2016).

A análise morfométrica das LPN confirma a atividade quimiopreventiva sugerida pela análise dos nódulos macroscópicos. A redução do número médio de pLPN nos grupos TB e EST, quando comparados ao grupo controle MD indica uma ação supressiva desses dois compostos nas pLPN, o tipo mais agressivo de LPN e que tendem a evoluir para o câncer (ANDERSEN et al., 2010). Os aumentos de mais de 2 vezes observados na porcentagem da área ocupada por rLPN nos grupos TB, TC e EST quando comparados ao grupo MD, embora não sejam diferentes do ponto de vista estatístico, sugerem a indução da remodelação das LPN. Isso indica o retorno ao fenótipo supostamente “normal” do tecido hepático, conforme observado em estudos anteriores com TB (DE CONTI et al., 2012) e com EST derivados da TB e do óleo de linhaça (HEIDOR et al., 2016). Esse retorno se dá devido ao metabolismo das células pré-neoplásicas, que são mais suscetíveis do que as células normais do fígado ao estímulo da replicação celular ou da morte celular. Consequentemente, o tecido pré-neoplásico pode preferencialmente crescer ou morrer durante o tratamento adequado. Tratamentos que favorecem a apoptose e menor replicação celular resultam na eliminação de clones de células pré-neoplásicas do fígado e reduzem o risco do desenvolvimento de câncer (SCHULTE-HERMANN et al., 1995).

Diversas evidências na literatura demonstram que a tanto a proliferação celular como a apoptose se encontram aumentadas durante a hepatocarcinogênese (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; DE CONTI et al., 2012). Assim, as vias relacionadas à inibição da proliferação celular ou indução da apoptose são consideradas importantes alvos na quimioprevenção. Tanto o AB como a TB possuem ações relacionadas à inibição da proliferação celular e/ou indução da apoptose de

diversos tipos de células neoplásicas descritas na literatura, como células de câncer de cólon (LI et al., 2018; CAO et al., 2019), mama (ABE; KUFÉ, 1984; SEMAAN et al., 2020) e, fígado (HEIDOR et al., 2012; WANG et al., 2013).

No presente estudo, a menor porcentagem de núcleos marcados para PCNA nos grupos TB, TC e EST em comparação ao grupo controle MD sugere que a inibição da proliferação celular pode ser um mecanismo de atividade quimiopreventiva dos EST. Além disso, a maior porcentagem de corpúsculos apoptóticos nos grupos MD, TB, TC e EST em relação ao surrounding do mesmo grupo pode estar relacionada a um efeito seletivo dessas substâncias em células pré-neoplásicas.

O efeito seletivo do AB em células normais e neoplásicas tem sido documentado em diversos tipos de câncer (WANG et al., 2020). Esta substância promove a proliferação de células normais, enquanto nas células neoplásicas é observada uma redução da proliferação celular. Uma vez que o AB é utilizado como metabólito energético, esse efeito seletivo é explicado pelo efeito Warburg nas células neoplásicas (LI et al., 2018). De maneira geral, a utilização do AB como principal fonte de energia pelas células saudáveis evita o acúmulo intracelular de butirato e seu efeito pró-apoptótico. Nas células neoplásicas, que tem seu metabolismo energético alterado de butirato para glicose, o AB se acumula levando a alterações na regulação epigenética como a inibição das HDAC, suprimindo epigeneticamente a proliferação dessas células (MARKIEWICZ et al., 2021).

O índice de crescimento ajustado pode indicar desequilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose. No presente estudo foi observado um predomínio da proliferação em relação a apoptose ($ICA > 1$) em todos os grupos submetidos ao modelo do RH e tratados com MD, TB, TC ou EST, tanto no surrounding quanto nas pLPN e rLPN. Esse predomínio é sustentado por uma série de vias que se encontram alteradas já durante os estágios iniciais da carcinogênese e culminam em hepatócitos com capacidade excessiva de proliferação e evasão da apoptose (MARQUARDT; ANDERSEN; THORGEIRSSON, 2015). A observação de menores ICAs no grupo EST tanto nas pLPN quanto nas rLPN em relação ao surrounding do mesmo grupo sugere uma ação seletiva dos EST, que, assim como outros agentes

quimiopreventivos, atuam mais nas LPN que no surrounding (ONG et al., 2012). Além disso, os menores ICAs do grupo EST tanto nas pLPN quanto nas rLPN em comparação ao grupo MD indica um equilíbrio entre proliferação celular e apoptose, em relação ao grupo controle tratado com MD. Neste sentido, os EST apresentam atividade relacionada à inibição do crescimento de LPN, sugerindo atividade quimiopreventiva seletiva por parte destes lipídios na hepatocarcinogênese experimental.

A atividade quimiopreventiva dos EST aqui estudados pode estar relacionada às maiores concentrações hepáticas de AB nos animais desse grupo em relação ao animais do grupo controle MD. O aumento da concentração hepática de AB nos grupos tratados com TB e EST em relação ao grupo controle MD pode ser justificado pela presença de AB na composição tanto da TB, quanto dos EST. Nos grupos MD e TC, os quais não receberam tratamentos derivados de AB, a observação de níveis detectáveis de AB pode ser justificada pelo fato de o AB ser um produto natural da fermentação de fibras alimentares (BURKITT, 1969). A maior concentração hepática de AB no grupo tratado com TC em relação ao grupo controle MD sugere que o AC, presente na composição da TC, poderia estar atuando como um agente facilitador da absorção intestinal (MCCARTNEY; GLEESON; BRAYDEN, 2016), aumentando a absorção de AB proveniente da fermentação das fibras alimentares. A determinação da concentração hepática de AC forneceu resultados de acordo com o esperado, ou seja, os grupos que receberam AC em seu tratamento apresentaram maiores concentrações de AC por grama de tecido hepático em relação ao controle MD. Além disso, o grupo TC apresentou maiores concentrações hepáticas de AC em relação aos grupos EST e TB, que se justifica pela maior presença de AC na composição da TC quando comparada aos EST e ausência de AC na composição da TB.

O estresse oxidativo é um fator crucial em todas as etapas da hepatocarcinogênese sob várias condições patológicas, além disso, também está envolvido na migração, invasão e metástase do HCC (FU; CHUNG, 2018). As células inflamatórias ativadas liberam radicais livres, como espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de óxido nítrico, que por sua vez podem causar danos ao DNA e levar a mutações genéticas, promovendo a transformação neoplásica (YANG et al.,

2014). Nesse sentido, biomarcadores de estresse oxidativo podem prever o risco e também a recorrência de HCC.

Na avaliação do dano no DNA pelo ensaio do cometa neutro, que avalia tanto quebras de fita simples quanto quebras de fita dupla do DNA (DSBs), os menores comprimentos de cometas observados nos grupos tratados com TB, TC e EST confirmam a atividade quimiopreventiva dos EST e sugerem que um dos mecanismos de ação desses lipídios está envolvido com a proteção contra danos ao DNA. Os danos no DNA relacionados à DSBs são considerados os mais deletérios, e, se não forem reparados, podem resultar em graves consequências para a sobrevivência celular, pois levam a alterações cromossômicas, instabilidade genômica ou morte celular (PODHORECKA; SKLADANOWSKI; BOZKO, 2010). Esse tipo de dano é seguido pela fosforilação da histona H2AX, originando a γ H2AX, que por sua vez recruta proteínas de reparo do DNA. Assim, os níveis de γ H2AX em LPN mostram-se importantes biomarcadores para prever o risco de desenvolvimento do HCC (MATSUDA et al., 2013). No presente estudo, os grupos TB e EST apresentaram menores níveis de γ H2AX quando comparados ao grupo controle MD, o que corrobora a observação anterior de que os EST atuam em mecanismos relacionados à proteção contra danos no DNA.

Na última década, a pesquisa relacionada ao genoma foi expandida significativamente em uma velocidade sem precedentes, partindo de estudos de um único gene para a comparação de múltiplos genomas entre diferentes genótipos tanto de uma mesma espécie, como de espécies diferentes (pangenômica e metagenômica), bem como vários estudos ômicos (incluindo genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e fenômica) (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016). O sequenciamento de nova geração é fruto desse avanço e combina vantagens químicas de sequenciamento exclusivas, diferentes matrizes de sequenciamento e tecnologia de bioinformática. Tal combinação possibilita um sequenciamento paralelo massivo de vários comprimentos de sequências de DNA ou RNA ou mesmo do genoma inteiro em um período de tempo relativamente curto (KAUR; ZHANG, 2022).

O conhecimento biológico prévio facilita muito a interpretação de dados de expressão gênica de alto rendimento. Redes causais construídas a partir de relações

individuais com suporte na literatura são particularmente adequadas para essa tarefa, uma vez que criam hipóteses de mecanismos que explicam as mudanças de expressão observadas em conjuntos de dados (KRÄMER et al., 2014). No presente estudo, ao contrário da hipótese inicial do projeto, em que esperávamos que o tratamento com EST modulasse genes relacionados com as junções de oclusão, assim como com a transição epitélio-mesênquima, os resultados do sequenciamento e as análises bioinformáticas realizadas sugerem uma modulação das vias relacionadas ao metabolismo das espécies reativas de oxigênio e do NRF2 no tecido hepático dos ratos tratados com os EST e submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese do RH. Além disso, é possível observar uma significativa compartimentalização dos genes diferencialmente expressos entre o grupo EST e o grupo controle MD.

O estresse oxidativo hepático está fortemente associado ao aumento do risco de HCC em pacientes com infecções crônicas por HBV e HCV (PARACHA et al., 2013). Além disso, a obesidade e os distúrbios metabólicos associados à inflamação também são capazes de promover aumento da secreção de citocinas (conhecidas como adipocinas) pelo tecido adiposo, bem como células inflamatórias, que incluem macrófagos hepáticos residentes ou células de Kupffer (YANG et al., 2014). A inflamação crônica é caracterizada pela expressão contínua de citocinas e recrutamento de células imunes para o fígado, e, muitos desses fatores modulam a homeostase redox no fígado. A disparidade na produção de ROS indevidas e sua eliminação termina em estresse oxidativo, eventualmente levando à hepatocarcinogênese (RAGHUNATH et al., 2018).

O fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide 2 (NRF2) é um fator de transcrição bem caracterizado que protege as células contra estresses oxidativos e eletrofilicos. O NRF2 é ativado por ROS e controla a expressão basal e induzível de mais de 200 genes que contêm elementos de resposta antioxidante e regulam a homeostase redox, conforme representado no **Anexo 2** (KIM; CHA; SURH, 2010). Sob condições de eliminação de ROS, a indução de DSBs aumenta o nível de proteína NRF2 e recruta NRF2 para locais de dano no DNA onde interage com ATR, uma proteína quinase relacionada ao fosfoinosítideo 3-quinase, resultando na ativação da via de sinalização ATR-CHEK1-CDC2. Isso, por sua vez, leva à parada do ciclo celular

em G2 e à promoção do reparo de recombinação homóloga de DSBs, preservando assim a estabilidade do genoma (SUN et al., 2020).

De modo a avaliar a resposta ao estresse oxidativo após o tratamento com as moléculas em estudo, foram realizados ensaios *in vitro* em células imortalizadas de hepatócitos humanos normais, THLE5B, e em células de carcinoma hepatocelular humano, Huh7. A redução de fluorescência de DCF em células THLE5B e Huh7 tratadas com NaBu, NaCa ou EST, em relação às células não tratadas, evidencia a redução de ROS pelos tratamentos e o potencial antioxidante destas moléculas, em especial NaBu e EST, que apresentaram níveis de fluorescência de DCF ainda menores quando comparado ao tratamento com NaCa em células THLE5B.

A hiperproliferação de células neoplásicas é acompanhada por alta produção de ROS, porém elas são adaptadas para proliferar em condições de desequilíbrio redox, no qual a carga oxidativa afasta o equilíbrio redox de um estado reduzido. As células tumorais conseguem isso aumentando seu status antioxidante para otimizar a proliferação impulsionada por ROS, ao mesmo tempo em que evitam os limiares de ROS que desencadeariam senescência ou apoptose (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020). Uma vez que os efeitos antioxidantes dos EST foram observados tanto em hepatócitos normais como em células de HCC, sabendo-se dessa adaptação das células neoplásicas em relação a ROS, pode-se presumir que os efeitos antioxidantes dos EST mostrariam-se mais efetivos no contexto da quimioprevenção do que no da quimioterapia do HCC, tal qual foi observado no ensaio *in vivo*.

6 Conclusão

Lipídios estruturados produzidos por interesterificação enzimática da TB com TC exercem atividade quimiopreventiva relacionada à inibição da proliferação celular e proteção contra danos no DNA, modulando vias relacionadas ao metabolismo das espécies reativas de oxigênio e do NRF2 em ratos Fischer-344 tratados durante as fases de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese. Tanto em células humanas neoplásicas como nas não neoplásicas, os EST apresentam capacidade antioxidante. Tal achado é importante uma vez que processo oxidativo é constante nas diversas etapas da hepatocarcinogênese, desde lesões pré-neoplásicas até o estabelecimento do HCC. Os resultados também confirmam a ocorrência de atividade quimiopreventiva da TB observada em estudos anteriores (HEIDOR et al., 2016; ANDRADE et al., 2019). Além disso, a TC mostrou potencial atividade quimiopreventiva do HCC *in vivo*, a qual até então só havia sido observada em culturas celulares de outros tipos de câncer (NARAYANAN et al., 2015).

7 Referências bibliográficas

ABE, M.; KUFÉ, D. W. Effect of sodium butyrate on human breast carcinoma (MCF-7) cellular proliferation, morphology, and CEA production. **Breast cancer research and treatment**, v. 4, n. 4, p. 269–274, 1984.

ALLY, A. et al. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. **Cell**, v. 169, n. 7, p. 1327–1341.e23, 2017.

ANDERSEN, J. B. et al. Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat. **Hepatology**, v. 51, n. 4, p. 1401–1409, 2010.

ANDRADE, F. D. O. et al. Antiangiogenic effects of the chemopreventive agent tributyrin, a butyric acid prodrug, during the promotion phase of hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 40, n. 8, p. 979–988, 2019.

ARAVALLI, R. N.; CRESSMAN, E. N. K.; STEER, C. J. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 2, p. 227–247, 2013.

AUNGST, B. J. Absorption enhancers: applications and advances. **The AAPS journal**, v. 14, n. 1, p. 10–18, 2011.

BARBISAN, L.F. et al. Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 295 - 308, 2003.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, 2009.

BERDASCO, M.; ESTELLER, M. Clinical epigenetics: seizing opportunities for translation. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 2, p. 109–127, 2019.

BLANCK, A.; WICKSELL, L.; ERIKSSON, L. C. Sulfation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in normal and nodular liver from male Wistar rats. **Toxicologic Pathology**, v. 15, n. 1, p. 103–105, 1987.

BLOT, W. J.; TARONE, R. E. Doll and Peto's Quantitative Estimates of Cancer Risks: Holding Generally True for 35 Years. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 4, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BURKITT, D. RELATED DISEASE—RELATED CAUSE? **The Lancet**, v. 294, n. 7632, p. 1229–1231, 1969.

CABALLERO, E. et al. Potential use of Avocado oil on structured lipids MLM-type production catalysed by commercial immobilised lipases. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–25, 2014.

CALVISI, D. F. et al. Disruption of β -catenin pathway or genomic instability define two distinct categories of liver cancer in transgenic mice. **Gastroenterology**, v. 126, n. 5, p. 1374–1386, 2004.

CAO, M. et al. Butyrate inhibits the proliferation and induces the apoptosis of colorectal cancer HCT116 cells via the deactivation of mTOR/S6K1 signaling mediated partly by SIRT1 downregulation. **Mol Med Rep**, v. 19, n. 5, p. 3941–3947, 2019.

CARUSO, S. et al. Genetics of HCC: Novel approaches to explore molecular diversity. **Hepatology**, p. 0–2, 2020.

CASTRO, H. F. DE et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, 2004.

C VELÁZQUEZ, O.; M LEDERER, H.; L ROMBEAU, J. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. **Adv Exp Med Biol**, v. 427, p. 123–34, 1997.

COLEMAN, W. B. Mechanisms of Human Hepatocarcinogenesis. **Current Molecular Medicine**, v. 3, n. 6, p. 573–588, 2005.

COLIN, D. J. et al. The role of reactive oxygen species and subsequent DNA-damage response in the emergence of resistance towards resveratrol in colon cancer models. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 11, p.1533–1533, 2014.

COLUMBANO, A. et al. Gadd45 β is induced through a CAR-dependent, TNF-independent pathway in murine liver hyperplasia. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 1118–1126, 2005.

CRAIG, A. J. et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 3, p. 139–152, 2020.

CZAUDERNA, C. et al. Ginkgo biloba induces different gene expression signatures and oncogenic pathways in malignant and non-malignant cells of the liver. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–19, 2018.

DE CONTI, A. et al. Chemopreventive effects of the dietary histone deacetylase inhibitor tributyrin alone or in combination with vitamin A during the promotion phase of rat hepatocarcinogenesis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 8, p. 860–866, 2012.

- DHANASEKARAN, R. et al. Genomic Medicine and Implications for Hepatocellular Carcinoma Prevention and Therapy. **Gastroenterology**, v. 156, n. 2, p. 492–509, 2019.
- DING, X. X. et al. Precision medicine for hepatocellular carcinoma: Driver mutations and targeted therapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 33, p. 55715–55730, 2017.
- DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J Natl Cancer Inst**, v. 66, n. 6, p. 1191-308, 1981.
- EDWARDS, J. R. et al. DNA methylation and DNA methyltransferases. **Epigenetics and Chromatin**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.
- FARBER, E.; SARMA, D.S. Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective. **Lab. Invest**, v. 56, n. 1, p. 4-22, 1987.
- FEO, F., et al. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. **Biochim Biophys Acta**, v. 1765, p.126-147. 2006.
- FU, Y.; CHUNG, F.-L. Oxidative stress and hepatocarcinogenesis. **Hepatoma research**, v. 4, 2018.
- FUJIWARA, N. et al. Risk factors and prevention of hepatocellular carcinoma in the era of precision medicine. **Journal of hepatology**, v. 68, n. 3, p. 526–549, 2018.
- FURUSE, M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 1, 2010.
- GANESAN, K.; JAYACHANDRAN, M.; XU, B. A critical review on hepatoprotective effects of bioactive food components. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 7, p. 1165–1229, 2018.
- GILLMAN, R. et al. The role of DNA damage and repair in liver cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1875, n. 1, p. 1884-93, 2021.
- GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 6, p. 333–351, 2016.
- GUARIENTO AH., et al. Transcriptomic responses provide a new mechanistic basis for the chemopreventive effects of folic acid and tributyrin in rat liver carcinogenesis. **Int J Cancer**, v.135, n.1, p. 7-18, 2014.
- GÜNZEL, D.; YU, A. S. L. Claudins and the modulation of tight junction permeability. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 2, p. 525-569, 2013.

- HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HARTSOCK, A.; NELSON, W. J. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1778, n. 3, p. 660–669, 2008.
- HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. Oxidative Stress in Cancer. **Cancer Cell**, v. 38, n. 2, p. 167–197, 2020.
- HEIDOR, R. et al. Anticarcinogenic Actions of Tributyrin, A Butyric Acid. **Prodrug Current Drug Targets**, v. 13, n. 14, p. 1720-9, 2012.
- HEIDOR, R. et al. The chemopreventive activity of the histone deacetylase inhibitor tributyrin in colon carcinogenesis involves the induction of apoptosis and reduction of DNA damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 276, n. 2, p. 129–135, 2014.
- HEIDOR, R. et al. The chemopreventive activity of butyrate-containing structured lipids in experimental rat hepatocarcinogenesis. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 2, p. 420–429, 2016.
- HONG, W. K.; SPORN, M. B. Recent Advances in Chemoprevention of Cancer. **Science**, v. 278, p. 1073–1078, 1997.
- IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 129–140, 2000.
- JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The Epigenomics of Cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683–692, 2007.
- KAUR, P.; ZHANG, B. New vision on the new era of genome study. **Functional & Integrative Genomics**, v. 22, n. 1, p. 1–2, 2022.
- KIM, H. et al. Telomere length, TERT and shelterin complex proteins in hepatocellular carcinomas expressing "stemness"- related markers. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 4, p. 746–752, 2013.
- KIM, J.; CHA, Y.-N.; SURH, Y.-J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. **Mutation research**, v. 690, n. 1–2, p. 12–23, 2010.
- KOJIRO, M.; ROSKAMS, T. Early Hepatocellular Carcinoma and Dysplastic Nodules. **Semin Liver Dis**, v. 25, n. 2, p. 133–142, 2005.
- KOMINSKY, S. L. Claudins: Emerging targets for cancer therapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, n. 18, p. 1–11, 2006.
- KOSIŃSKA, A.; ANDLAUER, W. Modulation of tight junction integrity by food components. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 951–960, 2013.

- KRÄMER, A. et al. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. **Bioinformatics**, v. 30, n. 4, p. 523–530, 2014.
- KULIK, L.; EL-SERAG, H. B. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 156, n. 2, p. 477–491, 2019.
- KUMARAVEL, T. S. et al. Comet Assay measurements: A perspective. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 53–64, 2009.
- KURMA, K. et al. DEN-induced rat model reproduces key features of human hepatocellular carcinoma. **Cancers**, v. 13, n. 19, p. 1–15, 2021.
- KUROIWA-TRZMIELINA, J. et al. Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: Efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 11, p. 2520–2527, 2009.
- LEE, N. P.; LUK, J. M. Hepatic tight junctions: From viral entry to cancer metastasis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 3, p. 289–295, 2010.
- LI, Q. et al. Butyrate Suppresses the Proliferation of Colorectal Cancer Cells via Targeting Pyruvate Kinase M2 and Metabolic Reprogramming. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 17, n. 8, p. 1531–1545, 2018.
- LIBBRECHT L., DESMET V., ROSKAMS T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. **Liver International**, v. 25, p.16-27, 2005.
- LIEBER, C. S. et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 3, p. 502–509, 2004.
- LIU, M.; JIANG, L.; GUAN, X. Y. The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: A recent update. **Protein and Cell**, v. 5, n. 9, p. 673–691, 2014.
- LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16018, 2016.
- LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nature reviews. Disease primers**, v. 7, n. 1, p. 1–28, 2021.
- LUGER, K.; HANSEN, J. C. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 15, n. 2, p. 188–196, 2005.
- MARKIEWICZ, L. H. et al. Phytate and Butyrate Differently Influence the Proliferation, Apoptosis and Survival Pathways in Human Cancer and Healthy Colonocytes. **Nutrients**, v. 13, n. 6, 2021.
- MARQUARDT, J. U. et al. Human hepatic cancer stem cells are characterized by common stemness traits and diverse oncogenic pathways. **Hepatology**, v. 54, n. 3, p. 1031–1042, 2011.

- MARQUARDT, J. U.; ANDERSEN, J. B.; THORGEIRSSON, S. S. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 11, p. 653–667, 2015.
- MARTIN, J.; DUFOUR, J.-F. Tumor suppressor and hepatocellular carcinoma. **World journal of gastroenterology**, v. 14, n. 11, p. 1720–1733, 2008.
- MATSUDA, Y. et al. DNA damage sensor γ -H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 5970–95, 2013.
- MAZZANTINI, R. PIETRO; DE CONTI, A.; MORENO, F. S. Persistent and remodeling hepatic preneoplastic lesions present differences in cell proliferation and apoptosis, as well as in p53, Bcl-2 and NF- κ B pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 538–546, 2008.
- MCCARTHY, P.J. et al. Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v.12, p. 209 – 214, 1997.
- MCCARTNEY, F.; GLEESON, J. P.; BRAYDEN, D. J. Safety concerns over the use of intestinal permeation enhancers: A mini-review. **Tissue barriers**, v. 4, n. 2, p. e1176822–e1176822, 2016.
- MERLO, L. M. F. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 12, p. 924–935, 2006.
- MICHAEL, A. O. A. et al. Proteomic analysis of laser capture microdissected focal lesions in a rat model of progenitor marker-positive hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 16, p. 26041–26056, 2017.
- NAKABAYASHI, H. et al. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. **Cancer research**, v. 42, n. 9, p. 3858–3863, 1982.
- NARAYANAN, A. et al. Anticarcinogenic properties of medium chain fatty acids on human colorectal, skin and breast cancer cells in vitro. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 5014–5027, 2015.
- NAULT, J. C. et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. **Nature Communications**, v. 4, p. 1–6, 2013.
- NIU, Z. S.; NIU, X. J.; WANG, W. H. Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 41, p. 9069–9095, 2016.
- OH, B. et al. High telomerase activity and long telomeres in advanced hepatocellular carcinomas with poor prognosis. **Nature**, v. 88, p. 144–152, 2008.
- OKOKO, E. Quality and utility of goat milk with special reference to India: An overview. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 4, n. 1, p. 56–63, 2007.

ONG, T. P. et al. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis with dietary isoprenic derivatives: cellular and molecular aspects. **Current cancer drug targets**, v. 12, n. 9, p. 1173–1190, 2012.

ONG, T. P.; MORENO, F. S. **Nutrition and Cancer Prevention**. [s.l.] The Royal Society of Chemistry, 2020.

ORTEGA, J. F. et al. Suppressing activity of tributyrin on hepatocarcinogenesis is associated with inhibiting the p53-CRM1 interaction and changing the cellular compartmentalization of p53 protein. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 24339–24347, 2016.

ORTEGA, J. F. et al. Butyrate-containing structured lipids act on HDAC4, HDAC6, DNA damage and telomerase activity during promotion of experimental hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 39, n. 4, p. 1–11, 2021.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured Lipids – Novel Fats with Medical , Nutraceutical , and Food Applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 3, 2002.

PARACHA, U. Z. et al. Oxidative stress and hepatitis C virus. **Virology journal**, v. 10, p. 251, 2013.

PERZ, J. F. et al. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. **Journal of Hepatology**, v. 45, p. 529–538, 2006.

PETRELLI, A., et al. MicroRNA/gene profiling unveils early molecular changes and nuclear factor erythroid related factor 2 (NRF2) activation in a rat model recapitulating human hepatocellular carcinoma (HCC). **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 228-241, 2014.

PEZZUTO, F. et al. Frequency and geographic distribution of TERT promoter mutations in primary hepatocellular carcinoma. **Infectious Agents and Cancer**, v. 12, n. 27, p. 1–9, 2017.

PIKOR, L. et al. The detection and implication of genome instability in cancer. **Cancer metastasis reviews**, v. 32, n. 3–4, p. 341–352, 2013.

PITOT, H. C. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. **The Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 859–860, 2001.

PODHORECKA, M.; SKLADANOWSKI, A.; BOZKO, P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. **Journal of nucleic acids**, 2010.

POGRIBNY, I. ; RUSYN, I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters**, v. 342, n. 2, p. 223–230, 2014.

POGRIBNY, I. P.; JAMES, S. J. Reduction of p53 gene expression in human primary hepatocellular carcinoma is associated with promoter region methylation without coding region mutation. **Cancer Letters**, v. 176, n. 2, p. 169–174, 2002.

RAGHUNATH, A. et al. Dysregulation of Nrf2 in hepatocellular carcinoma: Role in cancer progression and chemoresistance. **Cancers**, v. 10, n. 12, p. 1–29, 2018.

RASTOGI, R. P. et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n. 3, p. 603–607, 2010.

REBOUISSOU, S.; NAULT, J. C. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 72, n. 2, p. 215–229, 2020.

ROOMI, M. W.; FARBER, E.; PARKE, D. V. Changes in drug-metabolizing enzymes of rats in ciprofibrate-induced hepatic nodules. **Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems**, v. 27, n. 9, p. 951–960, 1997.

SADIKOVIC, B. et al. Cause and Consequences of Genetic and Epigenetic Alterations in Human Cancer. **Current Genomics**, v. 9, n. 6, p. 394–408, 2008.

SATYANARAYANA, A.; MANNS, M. P.; RUDOLPH, K. L. Telomeres and Telomerase: a Dual Role in Hepatocarcinogenesis. **Hepatology**, v. 40, n. 2, p. 276–283, 2004.

SCHAGDARSURENGIN, U. et al. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 22, n. 12, p. 1866–1871, 2003.

SCHULTE-HERMANN, R. et al. Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver. **Mutation research**, v. 333, n. 1–2, p. 81–87, 1995.

SCHULZE, K. et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. **Nature genetics**, v. 47, n. 5, p. 505–511, 2015.

SEMAAN, J. et al. Comparative effect of sodium butyrate and sodium propionate on proliferation, cell cycle and apoptosis in human breast cancer cells MCF-7. **Breast cancer**, v. 27, n. 4, p. 696–705, 2020.

SEMPLE-ROBERTS, E. et al. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **International journal of cancer**, v. 40, n. 5, p. 643–645, 1987.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27–36, 2009.

- SILVA, R. C. DA et al. Continuous enzymatic interesterification of lard and soybean oil blend: Effects of different flow rates on physical properties and acyl migration. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 23–28, 2012.
- SILVA, R. C. DA; GIOIELLI, L. A. Lipídios estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano, **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1253-1261, 2009.
- SOLT, D.; FARBER, E. New principles for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, p. 701 - 703, 1976.
- STAN, S. D. et al. Bioactive food components and cancer risk reduction. **Journal of cellular biochemistry**, v. 104, n. 1, p. 339–356, 2008.
- STEFANSKA, B. et al. Definition of the landscape of promoter DNA hypomethylation in liver cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 17, p. 5891–5903, 2011.
- SU, J. et al. Evaluation of Tributyrin Lipid Emulsion with Affinity to Low-Density Lipoprotein: Pharmacokinetics in Adult Male Wistar Rats and Cellular Activity on Caco-2 and HepG2 Cell Lines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 1, p. 62-70, 2006.
- SUN, X. et al. NRF2 preserves genomic integrity by facilitating ATR activation and G2 cell cycle arrest. **Nucleic acids research**, v. 48, n. 16, p. 9109–9123, 2020.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.
- SUZUKI, T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. **Animal Science Journal**, v. 91, p. 1–12, 2020.
- TABARIÈS, S.; SIEGEL, P. M. The role of claudins in cancer metastasis. **Oncogene**, v. 36, n. 9, p. 1176–1190, 2017.
- THORGEIRSSON, S. S.; GRISHAM, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Nature Genetics**, v. 31, p. 339–46, 2002.
- TOH, T. B.; LIM, J. J.; CHOW, E. K.-H. Epigenetics of hepatocellular carcinoma. **Clinical and Translational Medicine**, v. 8, n. 1, 2019.
- TOSHIKUNI, N. et al. Expression of telomerase-associated protein 1 and telomerase reverse transcriptase in hepatocellular carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 4, p. 833–837, 2000.
- VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Claudins and epithelial paracellular transport. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 403–429, 2006.
- VINCENT, K. et al. MicroRNAs, genomic instability and cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 8, p. 14475–14491, 2014.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. **Science**, v. 340, n. 6127, p. 1546–1558, 2013.

WANG, H.-G. et al. Anticancer effects of sodium butyrate on hepatocellular carcinoma cells in vitro. **International journal of molecular medicine**, v. 31, n. 4, p. 967–974, 2013.

WANG, W. et al. Sodium Butyrate Selectively Kills Cancer Cells and Inhibits Migration in Colorectal Cancer by Targeting Thioredoxin-1. **OncoTargets and therapy**, v. 13, p. 4691–4704, 2020.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of Cancer. **Cancer Research**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 1985.

WILLIS, W. M.; MARANGONI, A. G. Assessment of Lipase- and Chemically Catalyzed Lipid Modification Strategies for the Production of Structured Lipids. **J Am Oil Chem Soc**, v. 76, n. 4, p. 1–8, 1999.

World Cancer Research Fund International, American Institute for Cancer Research (eds). Diet, nutrition, physical activity and cancer: a global perspective: a summary of the third expert report, 3rd ed. **World Cancer Research Fund International**, London, UK, 2018.

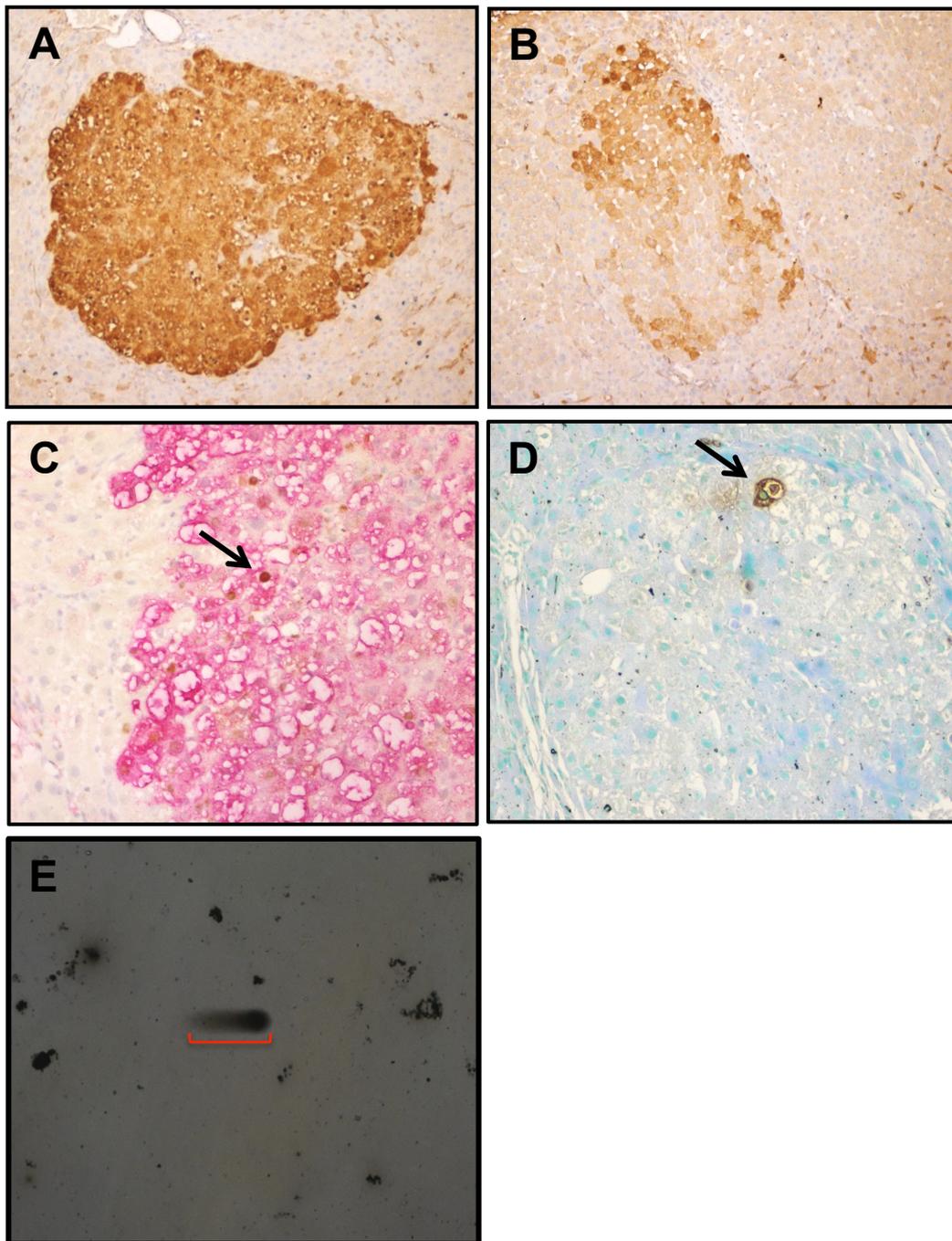
YAMAZAKI, Y. et al. Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens. **Molecular biology of the cell**, v. 22, n. 9, p. 1495–1504, 2011.

YANG, C. S.; WANG, H.; HU, B. Combination of chemopreventive agents in nanoparticles for cancer prevention. **Cancer prevention research**, v. 6, n. 10, p. 1011–1014, 2013.

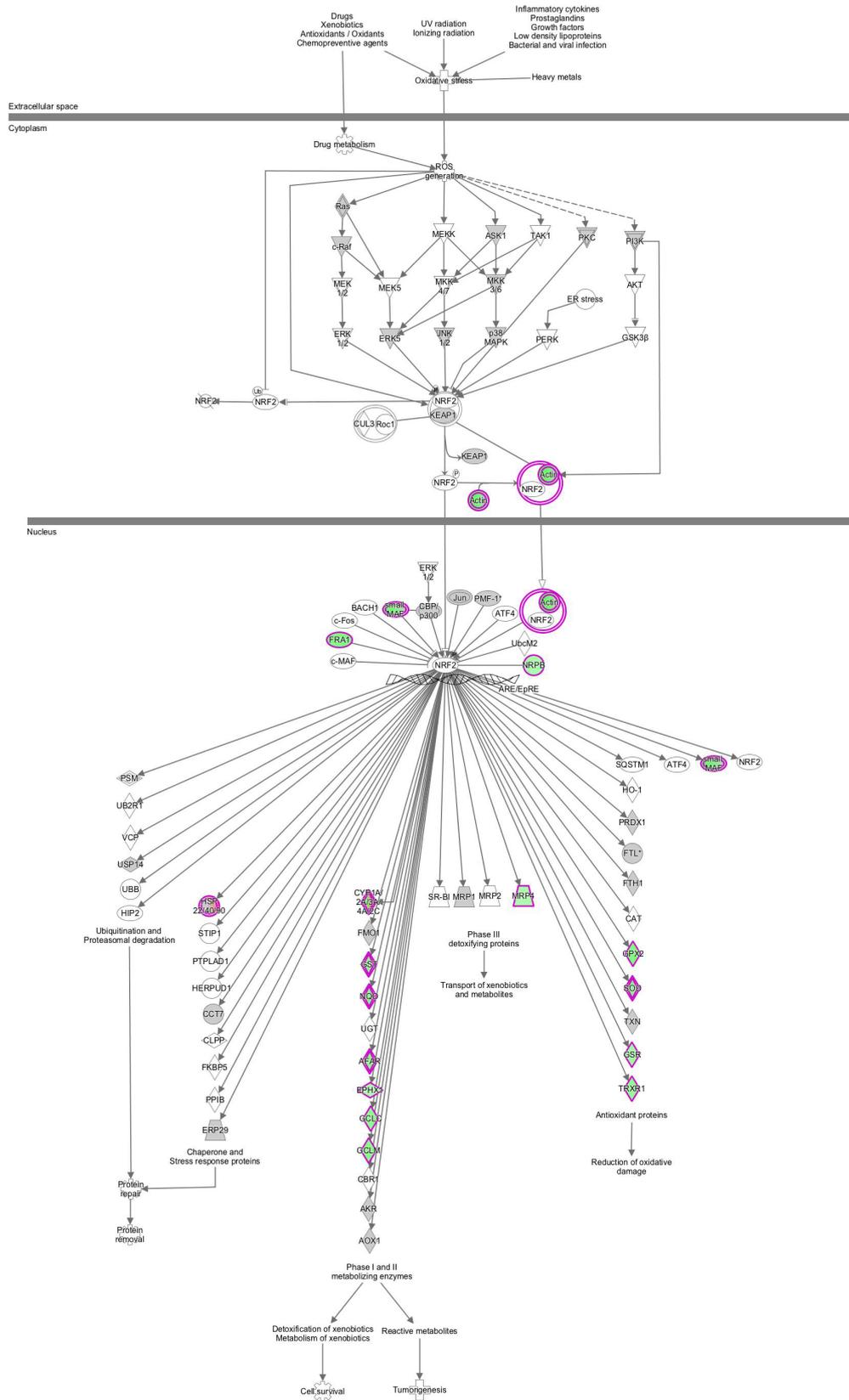
YANG, S. et al. Involvement of DNA Damage Response Pathways in Hepatocellular Carcinoma. **BioMed research international**, v. 153867, 2014.

ZEISEL, M. B.; DHAWAN, P.; BAUMERT, T. F. Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease. **Gut**, v. 68, n. 3, p. 547–561, 2019.

ZUCMAN-ROSSI, J. et al. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 149, n. 5, p. 1226–1239, 2015.



Anexo 1: Imagens microscópicas representativas de cortes histológicos de fígado. **(A)** Lesão preneoplásica persistente, marcação imunohistoquímica para GST-P (Objetiva 10x). **(B)** Lesão preneoplásica em remodelação, marcação imunohistoquímica para GST-P (Objetiva 10x). **(C)** Dupla marcação imunohistoquímica para GST-P (rosa) e PCNA (marrom). A seta indica núcleo marcado para PCNA (Objetiva 40x). **(D)** Corpúsculo apoptótico marcado pelo método TUNEL (Objetiva 40x). **(E)** Imagem representativa de um cometa obtido pelo ensaio do cometa neutro (Objetiva 40x).



Anexo 2. Esquema representativo das interações do fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide 2 (NRF2) e suas vias metabólicas.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 017.2018-P566

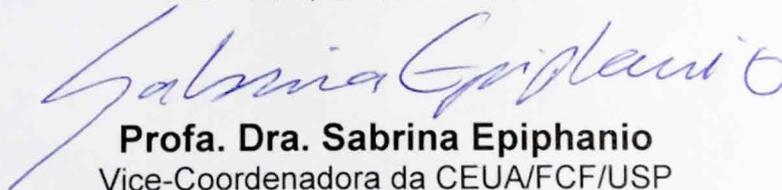
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Potencial quimiopreventivo de lipídios estruturados obtidos por interesterificação da tributirina com tricaprilina na hepatocarcinogênese experimental**, registrada com o nº **566**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Juliana Marques Affonso**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **13 de abril de 2018**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	13/04/2018 a 30/04/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato Fischer - 344
Número de animais	34
Peso/Idade	80 a 90g; 21 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério – CEMIB - UNICAMP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 20 de abril de 2018.


Profa. Dra. Sabrina Epiphânio
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP