

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

**POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO DE LIPÍDIOS
ESTRUTURADOS OBTIDOS DA TRIBUTIRINA E TRICAPRILINA
NA FASE DE PROMOÇÃO DA HEPATOCARCINOGENESE
EXPERIMENTAL**

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Thais Pereira D'Amico

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
Área de Nutrição Experimental

**POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO DE LIPÍDIOS
ESTRUTURADOS OBTIDOS DA TRIBUTIRINA E TRICAPRILINA
NA FASE DE PROMOÇÃO DA HEPATOCARCINOGENESE
EXPERIMENTAL**

Versão Original

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Thais Pereira D'Amico

Orientador: Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno

São Paulo

2022

THAIS PEREIRA D'AMICO

Potencial Quimiopreventivo de Lipídios Estruturados obtidos da Tributirina e
Tricaprilina na fase de Promoção da 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

D158p D'Amico, Thais
POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO DE LIPÍDIOS
ESTRUTURADOS OBTIDOS DA TRIBUTIRINA E TRICAPRILINA
NA FASE DE PROMOÇÃO DA HEPATOCARCINOGENESE
EXPERIMENTAL / Thais D'Amico. - São Paulo, 2022.
92 p.

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

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

Resumo

D'AMICO T. P. **Potencial Quimiopreventivo de Lipídios Estruturados obtidos da Tributirina e Tricaprilina na fase de promoção da hepatocarcinogênese experimental.** 2022. p.92, Tese (defesa doutorado direto) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A quimioprevenção do câncer refere-se ao uso de compostos naturais ou sintéticos para prevenir o desenvolvimento das neoplasias antes do estabelecimento da malignidade. O ácido butírico (AB) atua como um potente quimiopreventivo na hepatocarcinogênese, reduzindo o número e o tamanho de lesões pré neoplásicas persistentes (pLPN), induzindo a apoptose e modulando mecanismos epigenéticos. Já o ácido caprílico (AC), além da sua atuação como potencializador de absorção, vem sendo investigado na área da prevenção do câncer. Neste cenário, o objetivo do trabalho visa avaliar a atividade quimiopreventiva de lipídios estruturados (EST) obtidos por interesterificação enzimática da tributirina com a tricaprilina, na fase de promoção da hepatocarcinogênese experimental. Após o processo de interesterificação, o produto final apresentou novos triacilgliceróis com composição de duas moléculas de ácido butírico para uma de ácido caprílico. Ratos machos isogênicos da linhagem Fischer 344 foram submetidos ao modelo do hepatócito resistente, sendo distribuídos em dois grupos e tratados diariamente por via intragástrica com lipídios estruturados (EST) ou com o seu controle isocalórico, a maltodextrina (MD), durante a fase de promoção. Como esperado, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao peso inicial e final dos animais dos grupos MD e EST, o que indica ausência de toxicidade dos compostos administrados. Na análise macroscópica do fígado, foi observada uma redução de 33,3% no grupo EST em relação ao número médio de nódulos macroscópicos em comparação ao grupo MD, porém essa redução não atingiu diferença estatística ($p > 0,05$). Para a avaliação das lesões pré neoplásicas (LPN) foi utilizada a marcação imunoistoquímica para glutatona-S-transferase (GST-P). O grupo EST apresentou uma redução no número de lesões em remodelação e total GSTP-P+, quando comparado com o grupo MD ($p < 0,05$). Quando avaliada a % de corpúsculos apoptóticos e índice de proliferação celular, não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Animais tratados com lipídios estruturados apresentaram maiores ($p < 0,05$) concentrações de AC e AB por grama de tecido hepático em relação ao tratamento com maltodextrina. Em relação aos danos no DNA, o grupo EST resultou em cometas de comprimentos menores ($p < 0,05$), menores níveis de γ -H2AX ($p < 0,05$) e maiores concentrações de p53 nuclear, quando comparados aos animais que receberam maltodextrina, sugerindo uma proteção contra danos no DNA no grupo tratado com EST. Os resultados mostraram que o tratamento com EST resultou em ações efetivas na fase de promoção da hepatocarcinogênese experimental.

Palavras-chaves: Carcinoma hepatocelular, quimioprevenção, neoplasia, biotecnologia, lipídios estruturados, tributirina, tricaprilina.

ABSTRACT

D'AMICO T. P. **Chemopreventive Potential of Structured Lipids Obtained from Tributyrin and Tricaprylin in the Promotion Phase of Experimental Hepatocarcinogenesis. 2022. p.92, Thesis (direct doctoral defense) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.**

Cancer chemoprevention refers to the use of natural or synthetic compounds to prevent the development of neoplasms before the establishment of malignancy. Butyric acid (AB) acts as a potent chemopreventive in hepatocarcinogenesis, reducing the number and size of persistent pre-neoplastic lesions (pLPN), inducing apoptosis and modulating epigenetic mechanisms. Caprylic acid (CA), in addition to its role as an absorption enhancer, has been investigated in the area of cancer prevention. In this scenario, the objective of this work was to evaluate the chemopreventive activity of structured lipids (EST) obtained by enzymatic interesterification of tributyrin with tricaprylin, in the phase of promotion experimental hepatocarcinogenesis. After the interesterification process, the final product presented new triacylglycerols with a composition of two molecules of butyric acid to one of caprylic acid. Isogenic male Fischer 344 rats were submitted to the resistant hepatocyte model, divided into two groups and treated daily intragastrically with structured lipids (EST) or with its isocaloric control, maltodextrin (MD), during the promotion phase. As expected, there was no statistical difference ($p > 0.05$) in relation to the initial and final weight of the animals in the MD and EST groups, which indicates the absence of toxicity of the administered compounds. In the macroscopic analysis of the liver, a reduction of 33.3% was observed in the EST group in relation to the mean number of macroscopic nodules compared to the MD group, but this reduction did not reach a statistical difference ($p > 0.05$). For the evaluation of pre-neoplastic lesions (PNL) immunohistochemical staining for glutathione-S-transferase (GST-P) was used. The EST group showed a reduction in the number of remodeling lesions and total GSTP-P+, when compared to the MD group ($p < 0.05$). Animals treated with structured lipids had higher ($p < 0.05$) concentrations of AC and AB per gram of liver tissue compared to treatment with maltodextrin. Regarding DNA damage, the EST group resulted in comets of shorter lengths ($p < 0.05$), lower levels of γ -H2AX ($p < 0.05$) and high concentration of nuclear p53, when compared to animals that received maltodextrin, suggesting protection against DNA damage in the EST treated group. The results showed that EST treatment resulted in effective actions in the promotion phase of experimental hepatocarcinogenesis.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, chemoprevention, neoplasia, biotechnology, structured lipids, tributyrin, tricaprylin.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de poder vivenciar as experiências que a vida nos proporciona. Agradeço por me dar forças e saúde para enfrentar as diversas dificuldades ao longo do caminho.

À minha família, que sempre me apoiou nas minhas decisões e me fizeram forte quando eu já não conseguia mais. Obrigada por serem a minha base e a minha fortaleza.

Um agradecimento especial ao Professor Tit. Fernando Salvador Moreno, o qual me acolheu em seu laboratório e me encantou com o seu amor pela pesquisa. Agradeço por todos os ensinamentos, tanto na área acadêmica, como na vida. Saiba que você é uma grande inspiração para muitos pesquisadores, principalmente para mim. Serei uma eterna fã de seu trabalho e da sua pessoa. É um orgulho imenso ter sido orientada por você.

A minha grande irmã da vida, Juliana Marques Affonso. Sem você isso não seria possível. Além de uma grande colega de trabalho, tornou-se uma das pessoas mais especiais da minha vida. Eu serei sempre sua fiel escudeira e sua fã número 1. Você é incrível como pessoa e profissional. Você me inspira, me ensina e me faz ver o valor de uma amizade verdadeira. Não há palavras que caibam neste ou em qualquer outro agradecimento para expressar minha tamanha gratidão e amor por você. Obrigada por tudo.

Aos meus companheiros de laboratório, técnico Renato Heidor e Jossana Ruff. Obrigada por todo auxílio durante o desenvolvimento da pesquisa e pelas trocas diárias. Sou muito grata por todo suporte que me deram e por todos os ensinamentos adquiridos durante esses anos.

Ao meu grande parceiro Guilherme Pires Mauricio, minha força diária. Deixo aqui, meu agradecimento eterno a sua parceria, companheirismo e paciência comigo durante todo esse período. Você foi crucial para a conclusão dessa etapa

na minha vida e o seu apoio fez toda diferença durante todo o processo. Obrigada por ser esse ser humano incrível e por ter cruzado meu caminho.

Aos professores Eduardo Purgatto e Juliana Ract, os quais nos auxiliaram no desenvolvimento deste projeto. Saibam que eu tenho uma imensa admiração por vocês.

A todos os professores, funcionários e alunos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, os quais, de alguma forma, nos auxiliaram e nos ajudaram durante essa jornada. Agradeço imensamente a colaboração de cada um.

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 142313/2019-0.

“O menino está solitário quando a toupeira aparece pela primeira vez. Eles passam um tempo juntos, contemplando o desconhecido. Acho que o desconhecido é um pouco parecido com a vida – assustador às vezes, mas lindo”.

(O menino, a Toupeira, a Raposa e o Cavalo).

Lista de Abreviaturas

2-AAF	2-acetilaminofluoreno
AB	Ácido butírico
AC	Ácido caprílico
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCM	Ácidos graxos de cadeia média
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada
ATR	- Ataxia-telangiectasia and Rad3 related
AAV	adeno vírus associado
CBA	Compostos bioativos dos alimentos
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CDK2	ciclina-dependente quinase 2
CDK4	ciclina-dependente quinase 4
Chk2	- Checkpoint kinase 2
CYP3A4	citocromo p450 3A4
CYP2D6	citocromo p450 2D6
CYP1A2	citocromo p450 1D2
DCNT	doenças crônicas não transmissíveis
DEN	Dietilnitrosamina
DNMT	DNA metiltransferase
DMSO	dimetilsufóxido
DNMT1	DNA metiltransferase 1
DP	desvio padrão
DSBs	Quebras de fita dupla do DNA
EDTA	do inglês, " <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> "
EST	Lipídios estruturados
F-344	Fischer-344
GST-P	Glutathiona-S-transferase na forma placentária
HAT	Acetilases de histona
HBV	Vírus da hepatite B
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCV	Vírus da hepatite C
HDAC	histona desacetilases

HDACs inibidores de enzimas histonas desacetilases
HMG-CoA 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
HP hepatectomia parcial
Hif-1 α Fator induzível por hipóxia 1 α
KCl Cloreto de potássio
LPN Lesões pré-neoplásicas
MD Maltodextrina
Na₂HPO₄ fosfato dissódico
NaCl cloreto de sódio
NAFLD do inglês, "*Non alcoholic fatty liver disease*"
NF- κ B actor nuclear kappa B
NR4A1 receptor nuclear 4A1
miRNAs MicroRNAs
pLPN Lesões pré-neoplásicas persistentes
pNF- κ B actor nuclear kappa B fosforilado
pCHK2 Checkpoint kinase 2 fosforilada
PBS do inglês, "*Phosphate Buffered Saline*"
PCNA Antígeno nuclear de proliferação celular
PGG 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose
PMSF fenilmetilsulfonil fluoreto
PRDX5 peroxirredoxina-5
RH Hepatócito resistente
rLPN Lesões pré-neoplásicas em remodelação
ROS Espécies reativas de oxigênio
TB Tributirina
TBE Tris/Borato/EDTA
TBS-T solução salina tamponada com tris
TC Tricaprilina
TFA trifluoroacetilado
TUNEL do inglês, "*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling*"
TJs do inglês, "*Tight junctions*"
VEGF Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de Tabelas

Tabela 1. CBAs com atividade quimiopreventiva no desenvolvimento do HCC e seus mecanismos de ação.

Tabela 2. Peso corporal inicial e final, bem como peso hepático relativo, incidência total de nódulos e seu número médio dos animais submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

Tabela 3. Análise morfológica de lesões preneoplásicas GSTP⁺ em animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na fase de promoção da hepatocarcinogênese.

Tabela 4. 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) e lipídios estruturados (EST) nas etapas de promoção da hepatocarcinogênese.

Tabela 5. Avaliação do índice apoptótico (porcentagem de corpúsculos apoptóticos), em lesões totais, lesões pré neoplásicas persistentes (pLPN) e em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico distante das mesmas (surrounding) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) e lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

Tabela 6. Porcentagem (%) de LPN persistentes e em remodelação com marcação imunohistoquímica de p53 citoplasmática, em ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina (MD) e lipídios estruturados (EST).

Lista de Figuras

Figura 1. Fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do HCC e possíveis ações de prevenção.

Figura 2. Desenho experimental. Os animais foram submetidos ao modelo do hepatócito resistente. Os hepatócitos foram iniciados por meio de administração intraperitoneal de DEN em solução salina (NaCl a 0,9%). Após 2 semanas, os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses únicas em dias consecutivos, por gavagem, de 2-AAF dissolvido em dimetilsufóxido e óleo de milho (1,25mg/100g p.c.) seguida de uma hepatectomia parcial a 70% (HP). Os tratamentos foram iniciados após uma semana da hepatectomia parcial.

Figura 3. Composição em triacilgliceróis da tributirina **(A)**, tricaprilina **(B)** e lipídios estruturados **(C)**. Legenda: BBC/BCB triacilgliceróis compostos por dois ácidos butíricos e um ácido caprílico; CCB/CBC triacilgliceróis compostos por dois ácidos caprílicos e um ácido butílico; BBB triacilglicerol composto por três ácidos butíricos e CCC triacilglicerol composto por três ácidos caprílicos.

Figura 4. Representação gráfica do controle do peso do animal não submetido ao modelo experimental (não iniciado NI), ou submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina ou lipídios estruturados durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

Figura 5. Concentrações hepáticas de (i): ácido caprílico e (ii): ácido butílico no tecido hepático em ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

Figura 6. Média do comprimento dos cometas em μm dos fígados dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios

estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese. Maltodextrina (MD); Lipídios Estruturados (EST).

Figura 7. Quantificação de γ -H2AX dos fígados dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese. Maltodextrina (MD); Lipídios Estruturados (EST).

Figura 8. níveis de p53 dos fígados dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese. Maltodextrina (MD); Lipídios Estruturados (EST).

Figura 9. níveis de p53 nuclear nos fígados dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese. Maltodextrina (MD); Lipídios Estruturados (EST).

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Dieta, Nutrição e Câncer.....	17
1.2 Epidemiologia do Hepatocarcinoma Celular (HCC)	19
1.3 Hepatocarcinogênese.....	21
1.4 Modelo do Hepatócito Resistente (RH)	24
1.5 Quimioprevenção e HCC.....	25
1.6 Ácido Butírico e Tributirina.....	28
1.7 Tricaprilina.....	30
1.8 Lipídios Estruturados (EST)	31
2. OBJETIVO	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Preparo dos EST	35
3.2 Composição de triacilgliceróis dos EST	35
3.3 Ensaio <i>in vivo</i>	36
3.3.1 Modelo de hepatocarcinogênese do hepatócito resistente (RH)....	36
3.3.2 Eutanásia dos animais.....	38
3.3.3 Exame macroscópico do fígado.....	39
3.4 Dupla marcação por Imunoistoquímica para GST-P+ e PCNA.....	39
3.5 Avaliação da apoptose.....	40
3.6 Determinação das concentrações hepáticas de ácido butírico e caprílico	41
3.7 Ensaio do Cometa Neutro.....	41
3.8 Western Blot	42
3.9 Marcação por Imunoistoquímica para p53 citoplasmática	43
3.10 Análises Estatísticas	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Caracterização dos EST	45
4.1.1 Composição em triacilgliceróis	45

4.2 Ensaio <i>in vivo</i>	47
4.2.1 Peso corpóreo e hepático dos animais	47
4.2.2 Exame macroscópico do fígado.....	49
4.3 Morfometria de lesões pré neoplásicas positivas para GST-P.	50
4.4 Avaliação da proliferação.....	51
4.5 Avaliação da apoptose.....	52
4.6 Determinação das concentrações hepáticas de ácido butírico e caprílico	53
4.7 Ensaio do Cometa Neutro.....	54
4.8 Western blot.....	55
4.8.1 Quantificação da histona γ -H2AX	55
4.8.2 Quantificação da proteína p53 total	56
4.8.3 Quantificação da proteína p53 nuclear	57
4.9 Avaliação da proteína p53 citoplasmática por imunistoquímica.....	58
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9. ANEXOS	87

1) INTRODUÇÃO

1.1. Dieta, Nutrição e Câncer

A discussão a respeito de uma alimentação saudável vem sendo especulada há muitos anos, desde a época do velho testamento. Um exemplo a ser citado é do Profeta Daniel, o qual foi um israelita de linhagem nobre, levado de Judá para a Babilônia, em aproximadamente 605 a.C., para servir o rei Nebuchadnezzar do Império Babilônico.

Durante o seu mandato, o rei determinou que fossem servidas aos jovens capturados, entre eles o Daniel, as mesmas iguarias que eram servidas no banquete real (carnes vermelhas e vinho). Porém, Daniel propôs no seu coração não se contaminar com a porção das iguarias do rei. Isso porque possivelmente o alimento real era conflitante as regras alimentícias estabelecida na Lei de Moisés. Daniel então conversou com o Rei para estabelecer um acordo para que durante dez dias fosse servido a Daniel e três amigos apenas legumes e água. Ao final dos dez dias, eles seriam examinados e comparados com os demais jovens que estavam se alimentando com as iguarias do palácio. Após dez dias, Daniel, Hananias, Mizaél e Azarias estavam com aspecto mais saudável do que qualquer outro jovem (DANIEL 1:5-20).

Muitos estudos apontam para uma relação entre fatores ambientais e o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), que constituem um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (STEWART, 2014). Entre elas, destaca-se o câncer, que ocupa o segundo lugar em mortalidade, atrás somente das doenças cardiovasculares.

A hipótese dessa relação ganhou força por meio de estudos que comparavam indivíduos com idades semelhantes de diferentes lugares do mundo, com as taxas de surgimento da doença. Eles observaram que a taxa de incidência não seguia o padrão esperado para uma doença de causa apenas genética. Apesar dessas observações não terem sido suficientes para apontar a origem da doença, foram necessárias para mostrar que existem diferentes fatores envolvidos com a sua origem (DOLL, PETO, 1981). A partir disso, as pesquisas relacionando dieta, nutrição e câncer crescem exponencialmente (DOLL, PETO, 1981).

Os fatores de risco relacionados com a incidência do câncer podem estar ligados às características individuais e ambientais, como exposição a substâncias nocivas e estilo de vida. Os cinco principais fatores de risco relacionado ao estilo de vida são: elevado índice de massa corporal, baixo consumo de frutas e hortaliças, sedentarismo, etilismo e o tabagismo (MENTELLA et al., 2019). As pesquisas que avaliam os fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença determinam que entre fatores ambientais, o fator dietético representa de 30 a 35% (ANAND et al., 2008; BAENA, SALINAS, 2014).

Evidências científicas mostram que a adoção da dieta mediterrânea, ou seja, aumento no consumo de frutas, legumes, cereais e peixes e diminuição do consumo de carnes vermelhas e processados, é capaz de promover a longevidade, além de ser considerada um fator protetor contra o desenvolvimento do câncer (WILLET, 1995; XAVIER, 2009). Isso pode estar relacionado com a ação antioxidante dos compostos bioativos (CBAs) presentes nos alimentos, que possuem efeitos antiinflamatórios e anticarcinogênicos (DANIELE et al, 2017).

Um estudo realizado por Schwingshackl e Hoffman (2016) mostrou que a adesão a uma alimentação abundante em frutas e hortaliças e diminuição do consumo de carnes e alimentos processados, está associada a uma redução significativa na mortalidade e incidência geral do câncer, especialmente de neoplasias de mama, estômago, pâncreas, próstata e fígado (SCHWINGSHACKL, HOFFMANN, 2016). Em relação ao carcinoma hepatocelular (HCC), evidências afirmam que a dieta é reconhecida como um potencial fator de risco relacionado ao estilo de vida para o desenvolvimento da doença (GEORGE et al., 2021). Alimentos como peixes, grãos integrais, café e vegetais podem contribuir para a redução da incidência do HCC (FEDIRKO et al., 2013; SETIAWAN et al., 2015; BAMIA et al., 2015; YANG et al., 2019).

Com o objetivo de avaliar a relação entre a qualidade da dieta de populações com risco relativamente alto para o desenvolvimento de HCC, Luu e colaboradores (2021) utilizaram dados do Singapore Chinese Health Study, um estudo de coorte prospectivo, de 63.257 chineses com idades entre 45 e 74 anos. Destes, foram identificados 561 participantes potenciais. O resultado da avaliação apoiam a questão de que a adesão a uma dieta mais saudável pode

diminuir o risco de HCC. Além disso, os autores sugerem que a modificação da dieta pode ser uma abordagem eficaz para a prevenção primária da doença.

1.2. Epidemiologia do Hepatocarcinoma Celular (HCC)

O câncer é considerado um dos mais importantes problemas de saúde enfrentados na atualidade, principalmente nos países em desenvolvimento. Em 2025, são estimados 20 milhões de novos casos de câncer (INCA, 2018). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) (INCA, 2020).

O carcinoma hepatocelular (HCC) corresponde a 80% dos casos de câncer de fígado em todo o mundo, enquanto o colangiocarcinoma intra-hepático corresponde a 20% dos diagnósticos (ARAVALLI, CRESSMAN, STEER, 2013; BRAY et al., 2018). O HCC é a sexta neoplasia mais incidente e a terceira causa de morte relacionada ao câncer no mundo (SUNG et al., 2021). A distribuição global do HCC varia de acordo com os fatores de risco, sendo o mais importante as infecções virais hepatite B (HBV) e C (HCV). Outros fatores de risco relacionados ao HCC são o consumo excessivo de bebidas alcólicas, tabagismo e exposição a alimentos contaminados por aflatoxinas (WALY, YANGDE, YUXIANG, 2012; ARAVALI, CRESSMAN, STEER, 2013; BERTUCCIO et al., 2017; CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY et al., 2021).

A incidência elevada em partes da Ásia e da África oriental é o reflexo dos casos de infecção pelo HBV (BRAY, 2018). Já no Japão, Egito e América do Norte, os casos de HCC estão relacionados a infecção pelo vírus HCV (BERTUCCIO et al., 2017). No Brasil, 65,3% dos pacientes apresentam como fator etiológico do HCC o vírus HCV (PARANAGUÁ-VEZOZZO et al., 2014).

Além disso, países ocidentais apresentam uma elevação na incidência do HCC relacionada ao aumento dos casos de esteatose hepática não alcoólica (NAFLD – Sigla do inglês “*Non alcoholic fatty liver disease*”), que pode estar relacionada a obesidade e diabetes tipo 2, resultado da alteração no padrão alimentar da população desses países (WALY, YANGDE, YUXIANG, 2012;

LINDSEY, 2015; CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY et al., 2021). No caso dos EUA, as taxas de incidência de câncer de fígado mais do que triplicaram entre 1975 e 2011 (MITTAL, EL-SERAG, 2013). Esse aumento pode estar relacionado não só às mudanças alimentares, como também ao aumento da infecção crônica pelo HCV devido ao abuso de drogas injetáveis, que era comum nas décadas de 1960 e 1970 (MITTAL, EL-SERAG, 2013; LAFARO, 2015; BERTUCCIO et al., 2017). Assim, as principais causas do HCC podem ser evitadas por meio de medidas de saúde pública, como a vacinação, mudanças no comportamento alimentar e estilo de vida (TORRE et al., 2015).

A doença geralmente é diagnosticada em estágio avançado, limitando as abordagens terapêuticas (FORNER et al., 2014). Além disso, apresenta mau prognóstico; apenas 11% dos pacientes contam com uma sobrevida maior do que cinco anos (OHRI, 2016). Portanto, a identificação de novos alvos para prevenção e tratamento do HCC torna-se necessária para melhorar o prognóstico dos pacientes com esta doença.

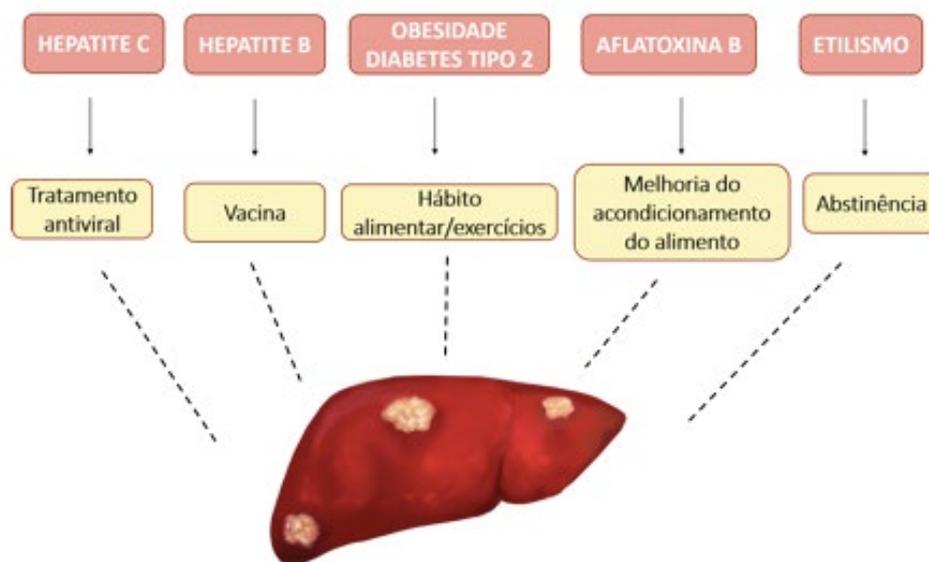


Figura 1. Fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do HCC e possíveis ações de prevenção.

1.3. Hepatocarcinogênese

A hepatocarcinogênese corresponde a um processo de longa duração, envolvendo o aparecimento de uma sequência de hepatócitos alterados, com modificações genéticas e epigenéticas. Essas células podem progredir para lesões pré-neoplásicas, que podem adquirir um fenótipo maligno com capacidade de crescimento autônomo e metastática (FARBER, CAMERON, 1980; COLEMAN, 2005).

Em relação a suas origens, são observadas duas vias de desenvolvimento: evolução estocástica (clonal) ou hierárquica (a partir de células que possuem propriedades funcionais características de células tronco) (ARAVALLI; CREESMAN; STEER, 2013). A primeira refere-se à mutação de células maduras que adquire um potencial proliferativo ilimitado, progredindo para o câncer (ARAVALLI, CREESMAN, STEER; 2013). Já a segunda está relacionada com o desenvolvimento da carcinogênese a partir de células quiescentes que possuem características de células progenitoras (MARQUARDT; ANDERSEN; THORGEIRSSON, 2015).

A carcinogênese é um processo que se desenvolve em múltiplas etapas, envolvendo o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas importantes para a regulação do complexo celular. Para que isso ocorra, é necessária metade ou dois terços da vida da espécie (FARBER, 1990). O desenvolvimento da carcinogênese compreende, basicamente, três etapas com diferentes características, sendo elas: iniciação, promoção e progressão (PITOT, 2001).

A iniciação corresponde a alteração irreversível da estrutura do DNA, que leva a mutação em genes específicos críticos para o estabelecimento desta fase, como os supressores de tumor e oncogenes (FARBER, 1990; PITOT, 2001; POGRIBNY; RUSYN, 2014). Já a promoção é caracterizada pela expansão clonal das células iniciadas em resposta ao estímulo de um agente promotor, originando as lesões pré – neoplásicas (FARBER, 1990; PITOT, 2001). Por último, a progressão, caracterizada pelo estabelecimento da malignidade devido a proliferação celular exacerbada e mutação em centenas ou milhares de genes (PITOT, 2001; FEO, 2006). Como as etapas de iniciação e progressão são

irreversíveis, a promoção é o principal alvo da ação de agentes quimiopreventivos (PITOT, 2001; TROSKO, 2005).

Nos últimos anos, houve um aumento da importância dos eventos epigenéticos no desenvolvimento da doença, mudando a visão de que o HCC seria uma doença apenas genética (POGRIBNY; RUSYN, 2014).

Eventos epigenéticos modulam a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA (MA et al., 2014). Essas alterações são transmitidas às células filhas durante a divisão celular (MA et al., 2014; EGGER et al., 2004). No HCC, as alterações epigenéticas envolvem processos tais como a metilação do DNA, modificações pós-tradução nos resíduos de aminoácidos de histonas como a acetilação, fosforilação e metilação; e regulação de miRNAs não-codificantes (SANTOS – ROSA; CALDAS, 2005; BÁRTOVA et al., 2008).

As histonas correspondem a um octâmero formado por dois pares de quatro histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e pela histona ligante (H1). Essa estrutura é responsável pelo empacotamento do DNA na cromatina (LIU; WANG; HSU, 2018). A acetilação e desacetilação das histonas está relacionada com a ativação ou inibição da transcrição gênica. Esse processo requer enzimas que adicionam ou retiram um grupo acetil dos aminoácidos, acetilases (HAT) e desacetilases de histonas (HDAC), respectivamente (SANTOS – ROSA; CALDAS, 2005; LIU; WANG; HSU, 2018). A acetilação afrouxa a cromatina, favorecendo o acesso de fatores de transcrição. Já a desacetilação, mantém a cromatina mais condensada, diminuindo o acesso dos fatores de transcrição (DAVIE, 2003; SANTOS – ROSA; CALDAS, 2005).

O aumento do estresse oxidativo é considerado como um fator importante no processo da carcinogênese (FU, CHUNG, 2018). Este é definido pela alteração no equilíbrio entre as substâncias pró-oxidantes e anti-oxidantes, levando a danos oxidativos (SIES, STAHL, SEVANI, 2005).

Substâncias pró-oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (ROs), são caracterizadas como elementos químicos altamente reativos e instáveis, capazes de transformar outras moléculas com as quais interagem (SRINIVAS et al., 2018). Elas são produzidas a partir da redução do oxigênio de compostos orgânicos, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (LIU et al., 2019). Essas substâncias são geradas a partir de mecanismos endógenos e exógenos, como metabolismo celular e exposição a carcinógenos, respectivamente (PISOSCHI

et al., 2021). A presença desses elementos no microambiente é crucial para a iniciação e progressão da neoplasia, podendo levar a danos no DNA (FU, CHUNG, 2018; LIU et al., 2018).

Os danos no DNA referentes a rupturas da cadeia dupla (DSBs) são seguidos pela fosforilação da histona H2AX (KUO, YANG, 2008; BARROSO, AGUILERA, 2021). A sua fosforilação ocorre por meio da proteína ataxia-telangiectasia mutada (ATM) da família quinases (JANG et al., 2012). A H2AX quando fosforilada é denominada γ -H2AX e é detectada após a exposição a agentes que alteram a integridade do DNA, sendo um estímulo para o recrutamento de proteínas para o reparo do mesmo (KUO, YANG, 2008; IVASHKEVICH, A. et al, 2012). A fosforilação da H2AX é a primeira etapa após o estabelecimento da DSBs (SMITH et al., 2010). A sua presença em lesões pré-neoplásicas pode ser considerada um importante biomarcador para prever o risco de desenvolvimento do HCC (MATSUDA et al., 2013).

Após danos no DNA, outras proteínas são acionadas com objetivo de interromper o ciclo celular e induzir a apoptose de células danificadas. Entre elas, destaca-se a proteína P53 (HAFNER et al., 2019).

Originalmente descrito em 1979, o gene *TP53* (*tumor protein 53*) foi o primeiro supressor de tumor a ser elucidado (VOGELSTEIN, LANE, LEVINE, 2000; KUNST et al., 2016). A sua importância está relacionada com a sua mutação regularmente presente nas neoplasias humanas (OREN, 2003; KUNST et al., 2016). Este gene é responsável por codificar a proteína P53, também conhecida como guardião do genoma (KUNST et al., 2016).

A função da proteína P53 está relacionada com a parada do ciclo celular no ponto de checagem quando há danos no DNA, impedindo assim, mutações (PARRALES, IWAKUMA, 2015; WU, HAYASHI, INOUE, 2006). Também apresenta mecanismos relacionados com a indução da apoptose, senescência, diferenciação e reparos no DNA (MAXIMOV, MAXIMOV, 2008; LEVINE, OREN, 2009). Além disso, atua como um importante fator de transcrição de centenas de genes que contribuem de várias maneiras para os seus efeitos biológicos (LEVINE, OREN, 2009; PARRALES, IWAKUMA, 2015; KUNST, 2016). Quando uma célula sofre mutações que a predispõem a se tornar maligna, a P53 é ativada para desencadear uma resposta para reparar o dano no DNA ou induzir a apoptose da célula afetada (OREN, 2003).

A P53 possui alguns mecanismos pouco elucidados de importação e exportação nuclear, mediados por uma série de fatores, inclusive por alterações pós – tradução, como acetilação e fosforilação (VOUSDEN, 2002; LIU, TAVANA, GU, 2019). A sua localização está intimamente relacionada com o desempenho da sua função, sendo desejável o seu deslocamento para o núcleo após o estresse celular como meio de inibir a proliferação de células mutadas (O'BRATE, GIANNAKAKOU, 2003; YAMAGUCHI et al., 2009). O seu acúmulo no citoplasma é um indicativo de mau prognóstico (O'BRATE, GIANNAKAKOU, 2003).

A sua ativação está relacionada com o estresse celular durante o desenvolvimento do câncer. Em condições normais, os níveis expressos da P53 estão reduzidos (KUNST et al., 2016). Já a sua inativação pode estar relacionada tanto a alterações genéticas, quanto epigenéticas (VOUSDEN, 2002).

1.4. Modelo do “Hepatócito Resistente” (RH)

Dentre os diversos modelos experimentais que recapitulam o desenvolvimento da hepatocarcinogênese em humanos, inclusive com a sincronização das fases de iniciação, promoção e progressão, destaca-se o do “Hepatócito Resistente” (RH), descrito por Solt e Farber (1976) e modificado por Semple-Roberts et al. (1987). Esse modelo consiste na administração da dietilnitrosamina (DEN), um carcinógeno completo e indireto, com maior capacidade de agente iniciador que, a partir da ação de enzimas do sistema citocromo P450, dá origem a metabólitos eletrofílicos capazes de alquilar estruturas de DNA, seguida pela administração do agente promotor 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), também completo e indireto com maior potencial promotor, capaz de selecionar os hepatócitos iniciados e inibir a proliferação dos hepatócitos normais. Por fim, os animais são submetidos à hepatectomia parcial (HP) a 70%, de modo a estimular a proliferação celular (SOLT; FABER, 1976, HEINDRYCKX; COLLE; VLIERBERGHE, 2009).

Ao final de 6 semanas após a administração da DEN, é possível identificar lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN), consideradas sítios de progressão para o HCC, e as em remodelação (rLPN), que retornam ao fenótipo normal do fígado (ANDERSEN et al., 2010). Nesse modelo, tanto as pLPN quanto as em

rLPN, que surgem devido ao desenvolvimento de alterações morfológicas caracterizadas por focos de hepatócitos alterados, podem ser facilmente distinguidas com marcadores específicos, como a glutathione – S- transferase na sua forma placentária (GST-P) (LIBBRECHT, DESMET, ROSKAMS, 2005; ANDERSEN et al., 2010). Aproximadamente 95% das LPN retornam ao fenótipo normal da célula do fígado e apenas 5% progridem para focos neoplásicos e HCC (FARBER; RUBIN, 1991; FEO et al., 2006). Assim, modelos de hepatocarcinogênese, como o do RH, são úteis para a avaliação da atividade quimiopreventiva (CONTI et al., 2012).

1.5. Quimioprevenção e HCC

A quimioprevenção do câncer refere-se ao uso de um ou mais compostos naturais ou sintéticos para prevenir as neoplasias durante as etapas de iniciação e promoção, antes do estabelecimento da malignidade (SPORN et al., 1976).

Com o indício de que o desenvolvimento do câncer estaria relacionado com fatores ambientais e que, com isso, poderia ser prevenido, iniciou-se a discussão em torno dos tipos de prevenção do câncer, que podem ser classificados em: prevenção primária, secundária e terciária (DE FLORA, FERGUSON, 2005). A prevenção primária está relacionada com a eliminação dos fatores de risco em populações saudáveis, como por exemplo vacinação, mudanças no estilo de vida e hábitos alimentares. Já a segunda tem como objetivo retardar a evolução da doença de indivíduos com lesões conhecidas como pré-neoplásicas ou até mesmo indivíduos com pré-disposição genética, inibindo etapas que podem levar a progressão do câncer (LI et al., 2020). Por último, a prevenção terciária visa pacientes com risco de recidiva ou surgimento de um novo câncer primário (HONG; SPORN, 1997).

Dentre os diversos agentes quimiopreventivos, destacam-se os compostos bioativos dos alimentos (CBAs), que podem ser encontrados em frutas e hortaliças (ONG, et al., 2012). Esses compostos possuem diferentes ações biológicas, capazes de controlar mais de uma via metabólica (GANESAN; JAYACHANDRAN; XU, 2018). Devido aos seus diferentes mecanismos de ação, a combinação de agentes quimiopreventivos tem sido considerada uma

alternativa importante para a prevenção do câncer (SPORN, 1997; STEWARD; BROW, 2013; HEIDOR et al., 2016).

Cada um desses compostos pode ser classificado de acordo com a sua fase de atuação. Enquanto uns atuam na fase inicial, chamados de agentes bloqueadores, outros atuam na fase de promoção, denominados agentes supressores. Porém, alguns podem atuar em ambas as fases, denominados agentes bloqueadores e supressores (WATTENBERG, 1996).

Os carcinógenos frequentemente exibem características chaves para o desenvolvimento da doença os quais, muitas vezes, são alvos da ação dos compostos bioativos, entre elas, pode-se dizer que os CBAs possuem ação na genotoxicidade, reparo do DNA e instabilidade genômica, alterações epigenéticas, estresse oxidativo, inflamação crônica e proliferação celular (SMITH et al., 2015).

Estudos revelam uma variedade de compostos bioativos dos alimentos (CBAs) que atuam de forma efetiva no campo da quimioprevenção do HCC. Na tabela a seguir, destaca-se alguns CBAs e seus mecanismos de ação.

Tabela 1. CBAs com atividade quimiopreventiva no desenvolvimento do HCC e seus mecanismos de ação.

CBAs	Mecanismos de ação	Referências
Farnesol	Diminuição da proliferação celular, danos no DNA, indução da apoptose e inibição da HMG-CoA redutase.	Ong et al., 2006; Chagas et al., 2009.
Geranilgeraniol	Diminuição da proliferação celular, danos no DNA, indução da apoptose e inibição da HMG-CoA redutase.	Espíndola et al., 2005; Ong et al., 2006; Vieira et al., 2011; Cardozo et al., 2011.

β -Ionona	Inibição da HMG-CoA redutase, diminuição da proliferação celular em pLPN, diminuição do número de células ovais, aumento das pLPN, diminuição p53 citoplásmica e aumento de miRNAs supressores de tumor.	Espíndola et al., 2005; Cardozo et al., 2011; Scolastici et al., 2014; Furtado et al., 2017; Miranda et al., 2019.
Luteína	Diminuição no número e tamanho de pLPN e danos no DNA.	Toledo et al., 2003; Moreno et al., 2007.
Licopeno	Diminuição no número e tamanho de pLPN, diminuição de danos no DNA e inibição da proliferação celular.	Toledo et al., 2003; Scolastici et al., 2008; Wang et al., 2010.
β -Caroteno	Diminuição de pLPN e células ovais, aumento de rLPN, indução da diferenciação celular, diminuição de danos no DNA, inibição da HMG-CoA e diminuição da proliferação celular.	Moreno et al., 1991; Moreno et al., 1995; Rizzi et al., 1997; Dagli et al., 1998; Naves et al., 2001; Moreno et al., 2002; Fonseca et al., 2005.
Vitamina A	Diminuição da proliferação celular, inibição de danos no DNA, aumento da conexina 43, diferenciação celular e retardo na proliferação de células ovais.	Naves et al., 2001; Moreno et al., 2002; Fonseca et al., 2005.
	Diminuição de pLPN, aumento de rLPN,	Chagas et al., 2011; Guariento et al., 2014.

Ácido Fólico (Vitamina B9)	diminuição da proliferação celular em pLPN, diminuição de danos no DNA e regulação de genes envolvidos com a angiogênese.	
Cafeína e Ácido clorogênico	Indução de enzimas de reparo ao dano no DNA, diminuição do risco de cirrose e alteração no metabolismo de xenobióticos.	Huber, Parzefall, 2005; Bravi et al., 2013; Bohn et al., 2014; Romualdo et al., 2020.
Tributirina	Inibidor de HDACs, diminuição de pLPN, aumento de rLPN, indução da apoptose, diminuição da P53 citoplasmática, aumento da P53 nuclear e diminuição de marcadores angiogênicos (HIF1- α).	Kuroiwa-Trzmielina et al., 2009; de Conti et al., 2012; de Conti et al., 2013; Guariento et al., 2014; Heidor et al., 2016; Ortega et al., 2016; Andrade et al., 2018; de Conti et al., 2020.
epigallocatequina-3-galato	Diminuição no número de LPNs, indução da apoptose, aumento da ativação de P53, diminuição da proliferação e inibição da DNMT1.	Hirose et al., 1993; Kuo, Lin, 2003; Umemura et al., 2003; Lee, Shim, zhu 2005; Kaufmann et al., 2009.

1.6. Ácido butírico e tributirina

Uma molécula com ação eficaz na quimioprevenção é o ácido butírico (AB), um ácido graxo de cadeia curta (AGCC) constituído por quatro átomos de carbono, e obtido através da fermentação de fibras alimentares não digeríveis por bactérias endógenas (HEIDOR et al., 2014). É considerado a principal fonte

de energia (70 - 90%) para os colonócitos, apresentando um papel fundamental para o seu desenvolvimento (MANRIQUE, GONZÁLEZ, 2017).

Estima-se que a maior taxa de fermentação das fibras ocorra no cólon, e que 83% dos AGCC produzidos são constituídos por acetato, propionato e butirato (CUMMINGS et al., 1987). A absorção do butirato ocorre tanto por difusão passiva, como por mecanismos de transporte ativo (VELLAZQUEZ; LEDERER; ROMBEAU, 1997). Estudos demonstraram que dietas com teor de fibra reduzido, culminam em menores concentrações de ácido butírico no colon de ratos, enquanto uma ingestão elevada resulta no aumento de sua concentração (CUMMINGS, 1981). Após a sua metabolização, o AB segue para corrente sanguínea e posteriormente atinge o fígado por meio da veia porta (BEAUVIEUX et al., 2001).

O ácido butírico é o principal AGCC com atividades antineoplásicas descritas na literatura, principalmente em linhagens de células neoplásicas de hepatocarcinoma e carcinoma de cólon (NAKANO et al., 1997; SAITO et al., 1998). Seus mecanismos de ação estão relacionados às suas propriedades anti-inflamatórias, diminuição da proliferação celular, além da modulação da expressão gênica pela inibição das enzimas desacetilases de histona (HDACs). Porém, apesar de ser um agente quimiopreventivo com ações promissoras, deve ser levada em consideração a sua farmacocinética (NAKANO et al., 1997; SAITO et al., 1998).

Devido a sua meia vida curta de 14 minutos (DANIEL et al., 1989), existe uma dificuldade em atingir uma concentração plasmática eficaz e, conseqüentemente, apresenta um uso limitado por via oral. A tributirina (TB), um triacilglicerol com três moléculas de ácido butírico esterificados em uma molécula de glicerol, é considerado um pró – fármaco do AB, pois apresenta um comportamento farmacocinético adequado para ser administrado via oral. (VINOLO et al., 2012; HEIDOR et al., 2014). Está bem estabelecido na literatura sua atuação no contexto da quimioprevenção da hepatocarcinogênese, por meio da redução do número e tamanho das pLPN, induzindo a apoptose e modulando processos epigenéticos, como a acetilação de histonas (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009). A tributirina é capaz de regular a expressão gênica por ser um potente inibidor de desacetilases de histonas (HDAC) (STELIOU, et al., 2012).

A TB também demonstrou propriedades antineoplásicas no câncer de próstata e no câncer de mama pela diminuição da proliferação celular e indução da apoptose (HEERDT et al., 1999; KUEFER et al., 2004). Nos estudos realizados pelo nosso grupo, a TB apresentou atividade quimiopreventiva em ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH) (KUROIWA – TRZMIELINA et al., 2009; DE CONTI et al., 2012).

Em investigações anteriores com administração de TB em animais submetidos ao modelo do RH, houve um aumento da atividade supressora de tumor da proteína p53. Isso pode estar relacionado com o aumento da acetilação da proteína, uma vez que a ação da tributirina está ligada a inibição das HDACs (de CONTI et al., 2013). Além disso, outro estudo durante a fase de promoção da carcinogênese hepática mostrou aumento nos níveis nucleares de p53 e manutenção de suas funções biológicas (ORTEGA et al., 2016).

Recentemente, foi observada a atuação da TB como um agente antiangiogênico nos estágios iniciais da hepatocarcinogênese. Os mecanismos envolvidos nesse evento ocorreram por meio da redução de Hif-1 α , subunidade do fator de transcrição Hif-1. Este regula a expressão de genes envolvidos na resposta à hipóxia, alguns dos quais promovem a neovascularização, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), responsável por estimular a proliferação das células do endotélio vascular e sua migração (ANDRADE et al., 2019). Tendo em vista a angiogênese como um processo crucial para o desenvolvimento do HCC, a atividade antiangiogênica da TB já nos estágios iniciais da hepatocarcinogênese, reforça a sua ação como agente preventivo contra o desenvolvimento do HCC.

1.7. Tricaprilina

A tricaprilina (TC) é um triacilglicerol, que apresenta três moléculas de ácido caprílico (AC) esterificadas na molécula de glicerol. O ácido caprílico é um ácido graxo de cadeia média (AGCM), constituído por 8 carbonos e pode ser encontrado em laticínios e no óleo de coco (McCARTNEY et al., 2016).

O ácido caprílico (C8), assim como outros AGCM estão sendo investigados pelas indústrias farmacêuticas como intensificadores de permeabilidade intestinal (PEs), com o objetivo de potencializar a absorção de

outros componentes por meio da modulação da barreira intestinal (BRAYDEN et al., 2020).

A octreotida oral, fármaco que possui o ácido caprílico como PE, encontra-se na fase III de estudos clínicos para o tratamento de acromegalia (MELMED et al., 2014; SAMSON et al., 2020). O estudo tem como justificativa promover a aceitabilidade do paciente ao tratamento, uma vez que os indivíduos apresentam certo desconforto ao tratamento por meio de injeções dolorosas (BRAYDEN et al., 2020). O mecanismo de ação do C8 está relacionado com a modulação de proteínas que compõem as *tight junctions* (TJs) no tecido epitelial intestinal (TUVIA et al., 2014).

Além da sua atuação como potencializador de absorção, o ácido caprílico vem sendo investigado na área da prevenção do câncer. Apesar da ausência de estudos *in vivo* que apresentam atividades quimiopreventivas, o estudo *in vitro* realizado por Narayanan (2015) demonstrou que este ácido graxo atua como agente antineoplásico em células de carcinoma colorretal humano, carcinoma epidermóide e células de adenocarcinoma da glândula mamária humana.

Os mecanismos envolvidos estão relacionados com a regulação negativa de proteínas críticas para a progressão do câncer, como CDK2 (ciclina-dependente quinase 2) e CDK4 (ciclina-dependente quinase 4), e regulação positiva de proteínas relacionados com a indução da apoptose, como *NR4A1* (peroxiredoxina 1) e P21 (inibidor da quinase dependente de ciclina 1) (NARAYANAN, 2015).

1.8. Lipídios Estruturados

Devido à evolução de processos biotecnológicos é possível se obter triacilgliceróis modificados a partir de uma mistura lipídica. Assim, ácidos graxos que naturalmente não estariam esterificados em uma mesma molécula de glicerol são produzidos sob a ação de uma reação de interesterificação, resultando em novos triacilgliceróis, denominados lipídios estruturados (EST) (OSBORN, AKOH, 1998)

Os lipídios estruturados foram desenvolvidos com o objetivo de viabilizar as formulações de novos produtos, uma vez que são capazes de agregar

algumas características como propriedades nutricionais, organolépticas e físicas. Um exemplo do uso deste processo é a produção de fórmulas infantis (SILVA, GIOIELLI, 2009; CABALLERO, et al. 2014). As reações de interesterificação ocorrem majoritariamente pelos métodos químicos e enzimáticos (CASTRO et al., 2004). Tanto a interesterificação química, quanto a enzimática levam a uma distribuição aleatória de ácidos graxos na molécula de glicerol, seja dentro da mesma molécula ou entre moléculas diferentes (SILVA et al., 2015). O processo ocorre com a hidrólise inicial do produto, seguido da reação de esterificação (ZHANG, LEE, WANG, 2020).

A interesterificação enzimática é feita por biocatalisadores, na forma solúvel ou imobilizada (OSBORN; AKOH, 2002). Esses biocatalisadores possuem especificidade em relação a quebra da ligação do ácido graxo na molécula de glicerol, tornando o produto da reação mais previsível (WILLIS; MARANGONI et al., 2008). Algumas de suas vantagens são condições de reações mais brandas devido a sua baixa energia de ativação, regioespecificidade, produção de lipídios mais puros e menor produção de subprodutos indesejáveis, que podem alterar as características físicas e organolépticas do produto final (FELTES et al, 2012; SILVA et al., 2015; MOREIRA et al., 2020). Já a desvantagem deste método está associada ao alto custo dessas enzimas, muitas vezes inviabilizando a produção em elevada escala industrial (WILLIS; MARANGONI et al., 2008).

Já a interesterificação química ocorre por meio do uso de catalisadores químicos, como metais alcalinos, que reorganizam aleatoriamente os ácidos graxos na molécula de glicerol (NORIZZAH, NUR AZIMAH, ZALIHA, 2018). Uma das desvantagens do método é a falta de controle sob a posição dos ácidos graxos no produto final, necessidade de temperaturas elevadas para reação e produção de resíduos indesejáveis (OSBORN; AKOH, 2002). Por outro lado, este é o método mais adotado pela indústria devido ao custo reduzido em produções em elevada escala (ROUSSEAU, MARAGONI 1998; RACT, GIOIELLI, 2003).

No contexto da quimioprevenção, com o objetivo de potencializar os efeitos biológicos de agentes quimiopreventivos na hepatocarcinogênese, Heidor e colaboradores (2014) produziram um lipídeo estruturado a partir da interesterificação enzimática do óleo de linhaça e tributirina, administrados

durante a fase de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese experimental. Os resultados demonstraram que o tratamento com EST inibe o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas persistentes (pLPN).

Uma vez que o ácido caprílico é utilizado em diversas formulações farmacêuticas como facilitador da absorção de fármacos pela mucosa do trato gastrointestinal (McCARTNEY et al., 2016), a interesterificação da tributirina com a tricaprilina seria uma estratégia para síntese de um sistema de carreamento do ácido butírico pelo ácido caprílico presentes no estruturado. Nesse sentido, espera-se que os lipídios estruturados aumentem as concentrações hepáticas de ácido butírico e desempenhe seus efeitos quimiopreventivos na fase de promoção da hepatocarcinogênese experimental.

2. Objetivo

Produzir lipídios estruturados por meio da interesterificação da tributirina, fonte de ácido butírico, com a tricaprilina, fonte de ácido caprílico, na proporção em que os EST apresentem 2 moléculas de ácido butírico e 1 molécula de ácido caprílico. Além disso, avaliar seu potencial quimiopreventivo quando administrados durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese experimental.

3. Material e Métodos

3.1. Preparo dos lipídios estruturados

Para o preparo dos lipídios estruturados (EST) foi utilizada uma mistura de tributirina (TB) (97% Aldrich, EUA) e tricaprilina (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., 2011). 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 Profa. Juliana N. R. Ract.

3.2. Composição de triacilgliceróis dos lipídios estruturados

As amostras de TB, TC e EST foram dissolvidas em acetona (5 mg/L) e diretamente analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) 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 carbonos equivalentes. As análises foram conduzidas em duplicatas e os resultados foram expressos como valores médios.

3.3. Ensaio *in vivo*

3.3.1 Protocolo Experimental - Modelo de hepatocarcinogênese do Hepatócito Resistente (RH)

Foram utilizados ratos machos isogênicos *Fischer 344* (F344), recém-desmamados, pesando inicialmente entre 80-90g e obtidos da colônia do biotério da CEMIB - UNICAMP. Foram solicitados 24 animais, os quais seriam distribuídos em 5 grupos diferentes:

Animal não iniciado (NI) composto por 1 animal; **Grupo maltodextrina (MD)** composto por 5 animais; **Grupo tributirina (TB)** composto por 6 animais; **Grupo tricaprilina (TC)** composto por 6 animais; **Grupo estruturado (EST)** composto por 6 animais. Devido á alteração inesperada do protocolo da hepatectomia parcial pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA), houve uma mortalidade acima do esperado para o procedimento, que levou à redução do número de grupos por ausência de animais, conforme explicado mais adiante.

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 565) 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). Após o período de aclimação de uma semana todos os animais foram submetidos ao modelo do “hepatócito resistente” (RH), de acordo com Semple-Roberts (1987), com exceção do rato não submetido a qualquer tratamento. A iniciação ocorreu pela administração intraperitoneal de dietilnitrosamina (DEN; Sigma EUA, 15 mg/100 g de peso corporal, p.c) dissolvida em solução de NaCl a 0,9%. Após um período de recuperação de 2 semanas os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses únicas em dias consecutivos, por gavagem, de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF; Sigma EUA, 1,25 mg/100 g de peso corporal, p.c) dissolvido em

dimetilsufóxido (DMSO) e óleo de milho. Vinte e quatro horas após a última aplicação de 2-AAF os animais foram submetidos a um potente estímulo mitogênico, representado por uma hepatectomia parcial (HP) a 70% sob anestesia com isoflurano, com indução de 3-4% e manutenção de 1-2% (MICHAEL et al., 2017). 15 minutos antes da cirurgia, os animais receberam o analgésico metadona na dose 1 mg/100 g de peso corporal, p.c., e 0,6 mg/100 g p.c de 12 em 12h durante 3 dias após HP. Os ratos submetidos ao modelo do RH foram aleatorizados e distribuídos em grupos experimentais uma semana após a HP, quando iniciados os tratamentos (de CONTI et al. 2012).

Assim, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- **Animal não iniciado (NI):** composto por 1 animal que não foi submetido ao modelo RH, nem tratado.
- **Grupo maltodextrina (MD):** composto por 5 animais submetidos ao modelo do RH que receberam diariamente maltodextrina (Nidex®, Nestlé, Brasil; 300 mg/100g p.c.) como controle isocalórico, por gavagem.
- **Grupo estruturado (EST):** composto por 6 animais submetidos ao modelo do RH que foram tratados diariamente com lipídios estruturados obtidos por interesterificação enzimática da tributirina com a tricaprilina por gavagem (180mg/100g p.c.).

As doses dos EST foram calculadas para fornecerem a mesma quantidade energética da TB [6 Kcal, na dose de 200 mg/100g de peso corpóreo (p.c)] já que com esta foi observada atividade quimiopreventiva na hepatocarcinogênese experimental (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012). Foi considerada para o cálculo a hidrólise completa, ou seja, um mol de triacilglicerol fornece, para efeito de cálculo, 3 mols de ácidos graxos e um de glicerol. Supondo que os lipídios estruturados apresentem, como esperado, a proporção mol/L de 2:1 (ácido butírico : ácido caprílico), a dose dos EST foi de 180mg/100g p.c. A maltodextrina (MD) foi utilizada na dose de 300mg/100g p.c. (KUROIWATRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2012; GUARIENTO et al., 2014). As doses foram calculadas a partir da dose de tributirina que apresenta efeito biológico de acordo com estudos do grupo (KUROIWATRZMIELINA et al.,

2009; de CONTI et al., 2012). Os animais receberam os tratamentos durante 4 semanas consecutivas.

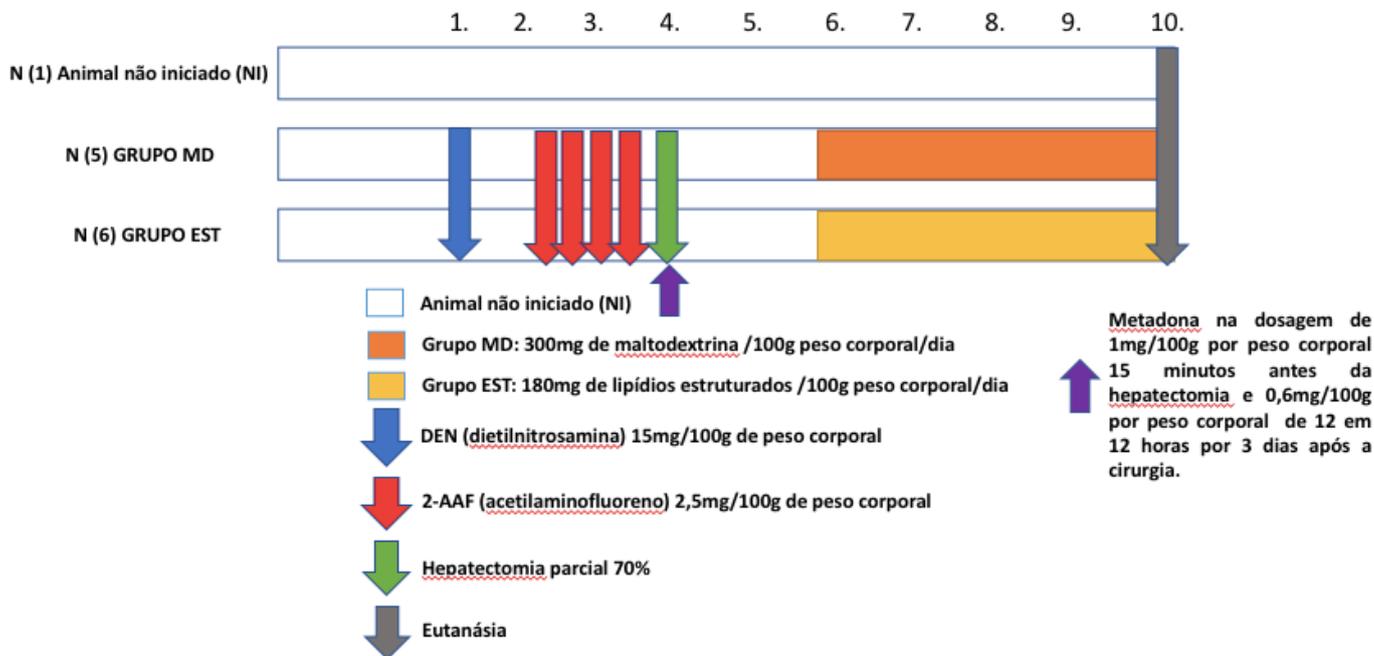


Figura 2. Desenho experimental. Os animais foram submetidos ao modelo do hepatócito resistente. Os hepatócitos foram iniciados por meio de administração intraperitoneal de DEN em solução salina (NaCl a 0,9%). Após 2 semanas, os hepatócitos iniciados foram selecionados pela administração de 4 doses únicas em dias consecutivos, por gavagem, de 2-AAF dissolvido em dimetilsulfóxido e óleo de milho (1,25mg/100g p.c.) seguida de uma hepatectomia parcial a 70% (HP). Os tratamentos foram iniciados após uma semana da hepatectomia parcial.

3.3.2. Eutanásia dos animais

Para a eutanásia, os animais permaneceram em jejum por 6 horas e foram pesados e tratados antes do procedimento. A eutanásia ocorreu por choque hipovolêmico por ocasião da secção da aorta abdominal sob anestesia com isoflurano (indução com 3-4% e manutenção com 1-2%). Em seguida, foi coletado o fígado, lavado em solução salina gelada a 0,9% e pesado em balança digital, seguindo-se, então, o exame macroscópico.

3.3.3. 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 para análise imunistoquímica. Estes fragmentos de fígado foram fixados em formalina tamponada a 4% por 48 horas e depois permaneceram em álcool a 70%. O restante dos lobos hepáticos foi devidamente identificado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e em seguida armazenado em freezer a -80° C (Anexo I).

3.4. Dupla marcação por Imunoistoquímica para GST-P+ e PCNA

Para avaliar o número, tamanho e a classificação das LPN, assim como a proliferação celular, foi realizada a dupla marcação imunistoquímica 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 peróxido de hidrogênio (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

cytometry 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 ao sistema de análise de imagens AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha). A morfometria foi expressa na forma de número e tamanho de pLPN ou rLPN (**Anexo II**) 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 IV**) em pLPN ou rLPN, ou área de tecido não pré-neoplásico ao redor das mesmas (surrounding).

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 quebras de fita de DNA pelo método TUNEL. Resumidamente, as lâminas com os cortes histológicos a 5µm foram desparafinizadas e hidratadas e, 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 enzima TdT por 1 hora em câmara úmida a 37°C e posteriormente lavados com o buffer 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 foi aplicado o substrato de peroxidase para o desenvolvimento de cor. A coloração foi realizada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Os cortes foram então imediatamente lavados com H₂O e contra corados com *methyl green*. A análise das lâminas foi realizada em microscópio com platina motorizada (Imager.M2, Zeiss, Alemanha) acoplada 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 distante das mesmas (surrounding). A quantificação

da apoptose foi expressa na forma de % de corpúsculos apoptóticos marcados em pLPN, rLPN ou surrounding (**Anexo III**), tanto dos grupos submetidos ao modelo do RH, como no animal não iniciado (NI).

3.6. Determinação das concentrações hepáticas de ácido butírico e ácido caprílico

A determinação das concentrações hepáticas de ácido butírico e ácido caprílico foi realizada pelo professor Dr. Eduardo Purgatto do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental 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, ester etilbutírico (Sigma, EUA) ou caprilato (Sigma, EUA). A quantificação foi feita em cromatógrafo gasoso 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).

3.7. Ensaio do cometa neutro

O rompimento das fitas do DNA foi avaliado em amostras de fígado armazenadas a -80 ° C, usando o ensaio do cometa conforme descrito anteriormente (TOLEDO et. al., 2003). Os tecidos foram homogeneizados em PBS a 4°C. As células isoladas foram imobilizadas em uma matriz de agarose (Sigma) 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 2V/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 50 × com software para análise de imagem (software AxioVision, versão 4.8,

Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, 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). Os resultados foram expressos como comprimento do cometa em μm , pois existe uma relação direta entre essa variável e o dano do DNA (McCarthy et al., 1997) (**Anexo V**).

3.8. 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 histona γH2AX e proteína p53 foram realizadas por western blot. Para tanto, 50 μg de proteínas e 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) e anticorpo p53 (Santa Cruz Biotechnology) 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 foi quantificada por densitômetro (Modelo GS-700 Imaging Densitometer, BIO-RAD, EUA) com software específico (Molecular Analyst, BIO-RAD, EUA). Para esse experimento foi utilizado o número de 5 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 e as bandas da proteína p53 foi normalizada pela proteína β -actina (Sigma, EUA) na diluição 1:1000. Os resultados foram expressos como fold change de intensidade de banda em relação ao grupo controle MD.

3.9. Marcação por Imunoistoquímica para p53 citoplasmática

As lâminas com os cortes histológicos a 5 μ m, 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 peróxido de hidrogênio (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 p53 (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:100 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). As lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris (CARDOZO et al., 2011), desidratadas e montadas em Permount. 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 ao sistema de análise de imagens AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha). A quantificação foi realizada por meio da expressão da % de

citoplasmas de hepatócitos positivos para p53 (**Anexo VI**) em pLPN ou rLPN.

3.10. Análises Estatísticas

Os experimentos foram realizados com amostras não pareadas, de forma inteiramente casualizada e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk). Na comparação entre apenas dois grupos, as análises estatísticas foram realizadas pelo teste *t Student*. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *Prism 8* (GraphPad, EUA) e adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Caracterização dos lipídios estruturados

4.1.1. Composição em triacilgliceróis

A **Figura 3** representa a composição em triacilgliceróis da tributirina, tricaprilina e lipídios estruturados, onde **A** corresponde ao ácido butírico, **B** ácido caprílico e **C** aos lipídios estruturados. Como esperado, a tributirina apresentou predomínio de BBB e a tricaprilina, de CCC. Após o processo de interesterificação, o produto final apresentou 67% de novos triacilgliceróis; destes, 42,3% representam, conforme o desejado, a estruturação na forma BBC/BCB, ou seja, dois ácidos butíricos e um ácido caprílico; e 24,7% representam a estruturação na forma BCC/CBC.

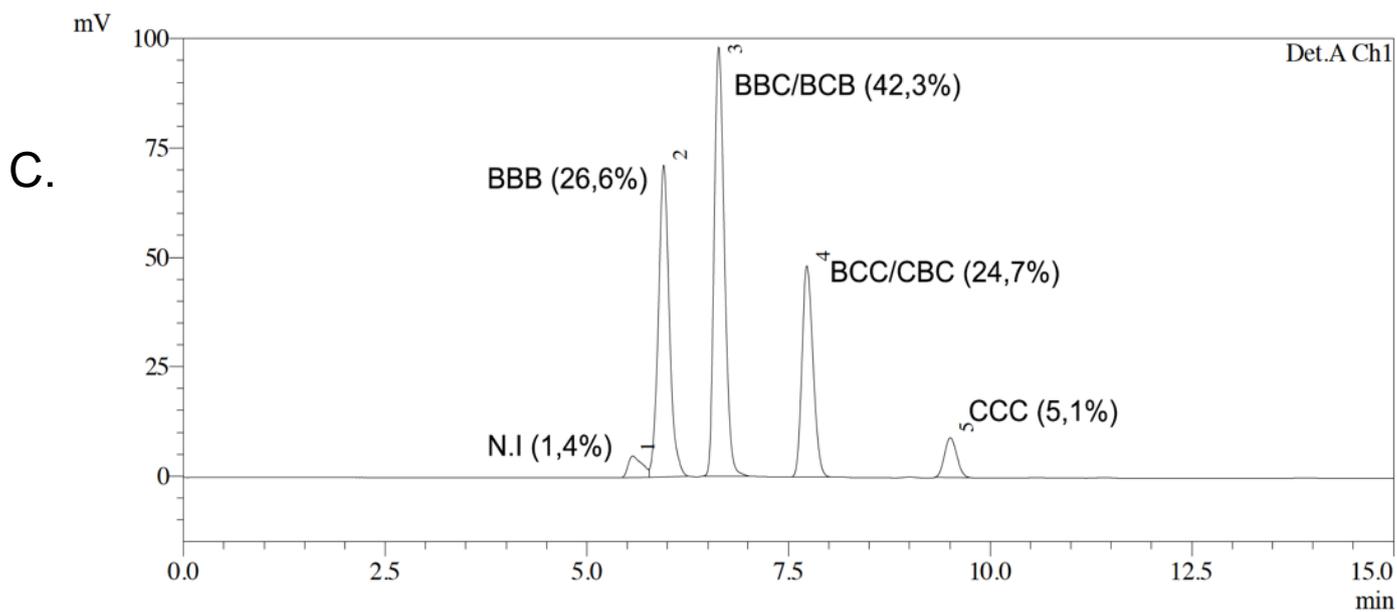
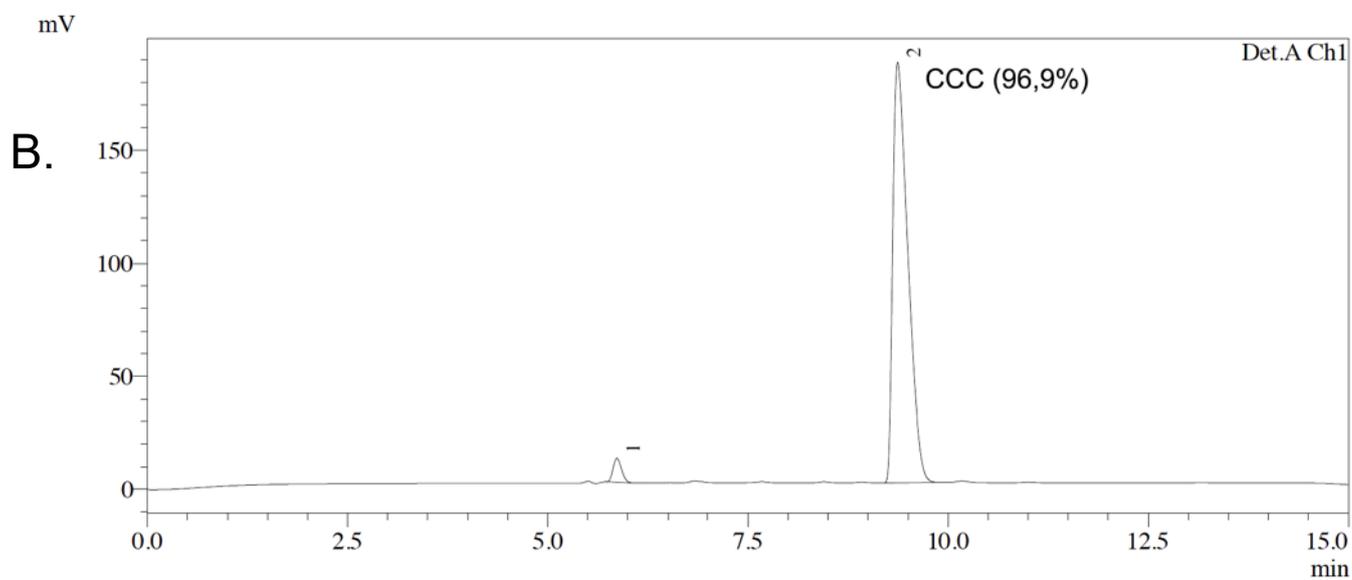
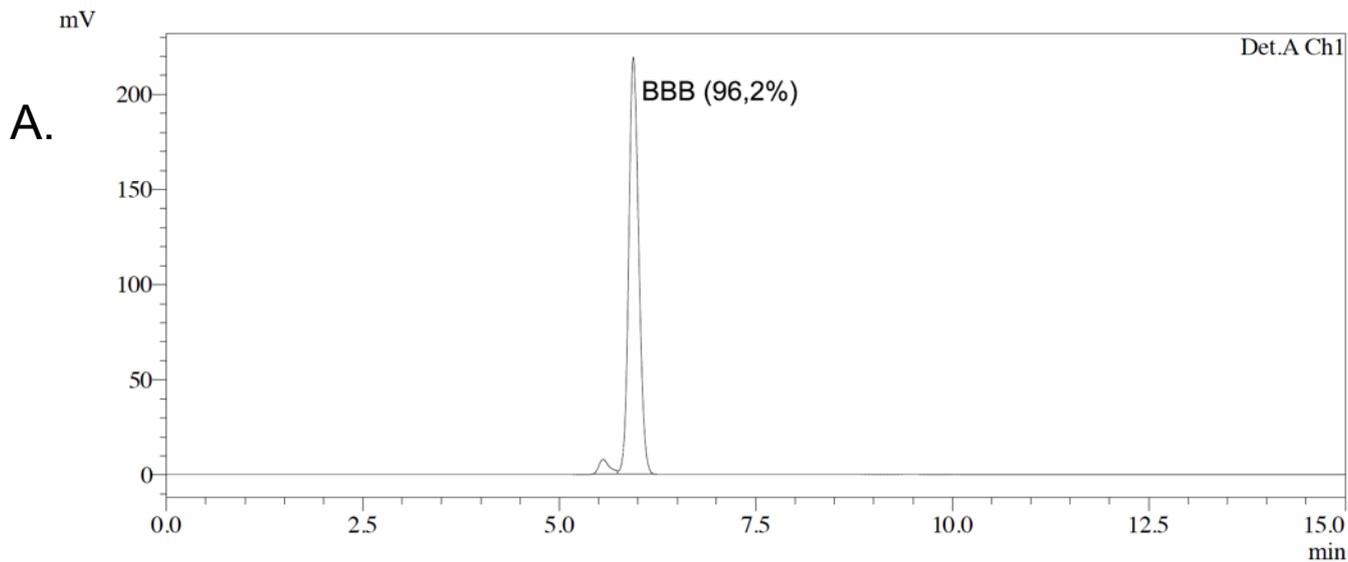


Figura 3. Composição em triacilgliceróis da tributirina **(A)**, tricaprilina **(B)** e lipídios estruturados **(C)**. Legenda: BBC/BCB triacilgliceróis compostos por dois ácidos butíricos e um ácido caprílico; CCB/CBC triacilgliceróis compostos por dois ácidos caprílicos e um ácido butírico; BBB triacilglicerol composto por três ácidos butíricos e CCC triacilglicerol composto por três ácidos caprílicos.

4.2. Ensaio *in vivo*

4.2.1. Peso corpóreo e hepático dos animais

O acompanhamento da evolução do peso corpóreo teve como objetivo avaliar a aplicação adequada do modelo RH, além de observar eventuais efeitos tóxicos das substâncias administradas. Na **Figura 4** observa-se queda na média do peso corporal dos animais de ambos os 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 nos dois grupos, tendo em vista a diferença entre as médias dos dois, que se manteve constante durante todo o experimento.

A mortalidade dos animais foi de 50%, valor superior ao observado em outros experimentos do laboratório (ESPINDOLA et al., 2005; HEIDOR et al., 2014).

Esse experimento foi o pioneiro no grupo a utilizar analgesia, conforme preconizado pelo Comitê de Ética. A incomum mortalidade pode estar relacionada a uma sobrecarga hepática causada por uma associação de fatores, tais como a retirada de 70% do fígado, administração do anestésico Isoflurano e administração do analgésico metadona na dose de 1 mg/100g p.c. 15 minutos antes da cirurgia e 0,6mg/100g p.c. de 12 em 12 horas no pós-cirúrgico durante 3 dias conforme orientação recebida pela veterinária ligada ao CEUA/FCFUSP.

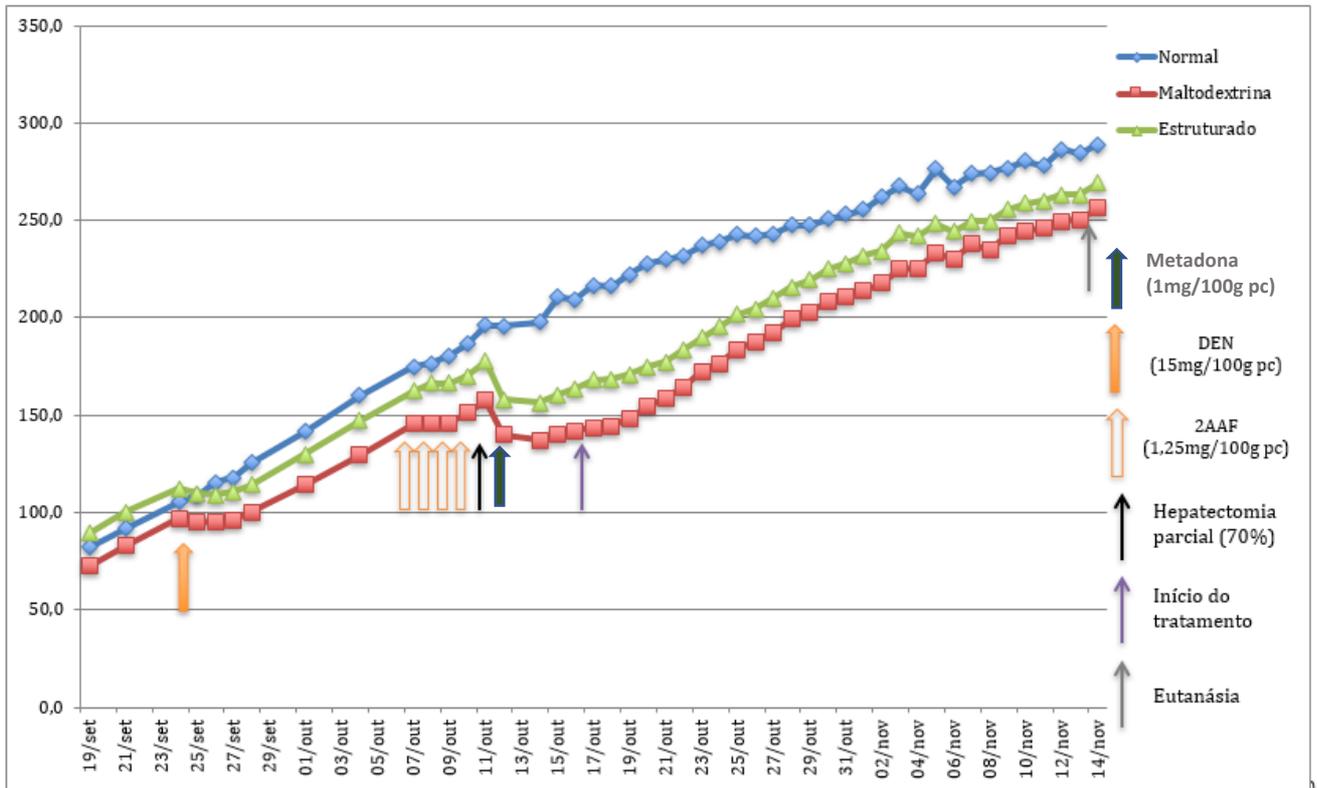


Figura 4. Representação gráfica do controle do peso do animal não submetido ao modelo experimental (não iniciado NI), ou submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina ou lipídios estruturados durante a etapa de promoção da hepatocarcinogênese. Animal NI: 1 animal; Grupo MD: 5 animais; Grupo EST: 6 animais.

4.2.2. Análise macroscópica do fígado de animais submetidos ao protocolo experimental

Após a eutanásia, os fígados foram coletados para análise macroscópica. Foi analisada a presença de nódulos na superfície de cada lobo do fígado, assim como em cortes com espessura de 3mm. Com relação aos pesos corpóreos dos ratos, tanto no início, como no final do experimento, não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos, demonstrando ausência de toxicidade dos compostos estudados. A incidência dos nódulos macroscópicos foi de 83,3% no grupo EST e de 100% no grupo MD, indicando que o modelo do RH foi adequadamente aplicado. O tratamento com os EST resultou na redução de 33,3% no número médio de nódulos hepáticos macroscópicos em comparação aos animais que receberam MD (controles). Porém esta diferença não atingiu significância estatística ($p>0,05$) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Pesos corporal inicial e final, bem como peso hepático relativo, incidência total de nódulos e seu número médio do animal não iniciado (NI) e submetidos ao modelo do Hepatócito Resistente, tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

Grupos (n)	Peso Corpóreo Inicial (g)	Peso Corpóreo Final (g)	Peso hepático (g)	Peso Hepático Relativo (%)	Incidência (%)	N médio de nódulos
NI (1)	82,0	288,9	10,10	3,5	0	0
MD (5)	72,7 ± 13,2	256,3 ± 9,6	10,7 ± 1,9	4,2 ± 0,7	100	72 ± 56,3
EST (6)	89,5 ± 14,8	269,2 ± 10,3	10,5 ± 1,15	3,9 ± 0,4	83,3	48 ± 42,5

Dados apresentados na forma de média ± desvio padrão da média. Normalização dos dados testada pelo teste *Shapiro – Wilk*, seguido do teste estatístico *t Student*.

4.3. Morfometria de lesões pré neoplásicas positivas para GST-P.

O grupo EST apresentou uma redução no número de lesões em remodelação e total GSTP-P+, quando comparado com o grupo MD ($p < 0,05$). Em relação % de área ocupada por LPN persistentes e total GST-P+, houve uma redução no grupo tratado com EST de 40,3% e 38,1% respectivamente, quando comparado com o grupo MD, porém sem diferença estatística. Em relação ao tamanho médio das lesões, não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Não foram observadas lesões GSTP+ no animal não iniciado. (**Tabela 3**).

Tabela 3. Análise morfométrica de lesões preneoplásicas GSTP+ em animais submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na fase de promoção da hepatocarcinogênese.

Grupos (n)	Número LPN GST-P+ / cm ²			Tamanho médio (mm ²)			% de área ocupada por LPN GST-P+		
	Total	pLPN	rLPN	Total	pLPN	rLPN	Total	pLPN	rpLPN
MD (5)	61,6±18,4	22,8±8,3	38,7±13,0	0,2±0,0	0,5±0,1	0,1±0,0	17,3±6,1	10,9±5,3	6,3±3,6
EST (6)	32,0±16,0*	12,8±8,7	14,0±11,3*	0,3±0,2	0,5±0,3	0,2±0,1	10,7±6,7	6,5±3,9	4,2±3,2

* Diferença em relação ao grupo MD. Normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk, seguido do teste estatístico *t Student*. Dados expressos na forma de média ± desvio padrão da média. pLPN = lesões preneoplásicas persistentes, rLPN = lesões preneoplásicas em remodelação.

4.4. Avaliação da proliferação celular

A avaliação da proliferação celular por meio da marcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) mostrou que os grupos tratados com MD 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. O grupo tratado com lipídios estruturados apresentou 30% e 45% menos núcleos marcados PCNA+ em comparação ao grupo tratado com MD tanto em pLPN, como nas rLPN, respectivamente. Porém, essa diferença não atingiu diferença estatística ($p > 0,05$).

Tabela 4. 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) e lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

Grupos (n)	Índice de proliferação (% de núcleos marcados com PCNA)			
	Total	Surrounding	pLPN	rLPN
MD (5)	18,0 ± 5,4	6,6 ± 3,2	21,2 ± 5,7*	12,8 ± 5,4*
EST (6)	11,4 ± 3,6	3,9 ± 2,6	14,7 ± 6,1*	7,0 ± 3,9*

Dados expressos na forma de média ± desvio padrão; *Diferença em relação ao *surrounding* no mesmo grupo, de acordo com teste de normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk, seguido do teste estatístico t *Student*.

4.5. Avaliação da apoptose

Em relação a apoptose, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais em relação a porcentagem de corpúsculos apoptóticos ($p > 0,05$). Da mesma forma, os grupos MD e EST não apresentaram diferença estatística significativa em relação a % de corpúsculos apoptóticos nas pLPN nem nas rLPN, em comparação com o *surrounding* do respectivo grupo ($p > 0,05$).

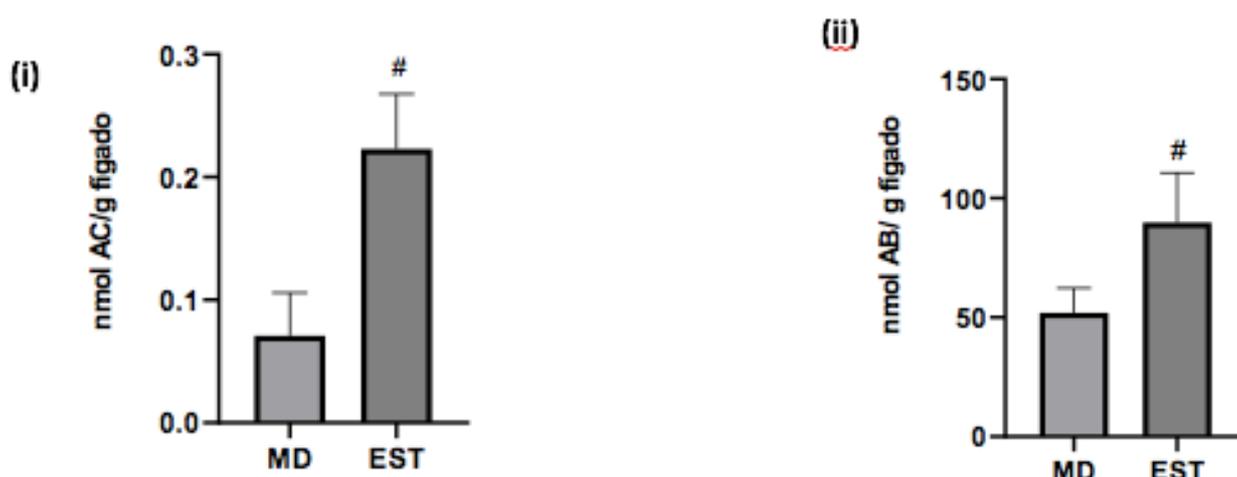
Tabela 5. Avaliação do índice apoptótico (porcentagem de corpúsculos apoptóticos), em lesões totais, lesões pré neoplásicas persistentes (pLPN) e em remodelação (rLPN), assim como em tecido não pré-neoplásico distante das mesmas (*surrounding*) nos cortes histológicos hepáticos de animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) e lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

Índice apoptótico (% de corpúsculos apoptóticos)				
Grupos (n)	Lesão Total	Surrounding	pLPN	rLPN
MD (5)	0,79 ± 4,34	0,08 ± 0,98	0,85 ± 5,72	0,5 ± 2,76
EST (6)	0,46 ± 3,77	0,1 ± 1,41	0,49 ± 4,87	0,43 ± 3,52

Dados expressos na forma de média ± desvio padrão da média. pLPN= lesões preneoplásicas persistentes, rLPN=lesões preneoplásicas em remodelação. Normalização dos dados testada pelo teste *Shapiro – Wilk*, seguido do teste estatístico *t Student*.

4.6. Determinação das concentrações hepáticas de ácido butírico e ácido caprílico

Foram também determinadas as concentrações de ácido caprílico (AC) e de ácido butírico (AB) no tecido hepático dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com MD ou EST durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese. Em relação às concentrações hepáticas de ácido caprílico, observa-se que os animais do grupo EST, como esperado, apresentaram maiores concentrações em relação aos animais do grupo MD ($p < 0,05$) (**Figura 5 i**). No que diz respeito ao ácido butírico, o grupo EST, também como esperado, apresentou maior concentração hepática ($p < 0,05$) em relação ao grupo MD (**Figura 5 ii**).

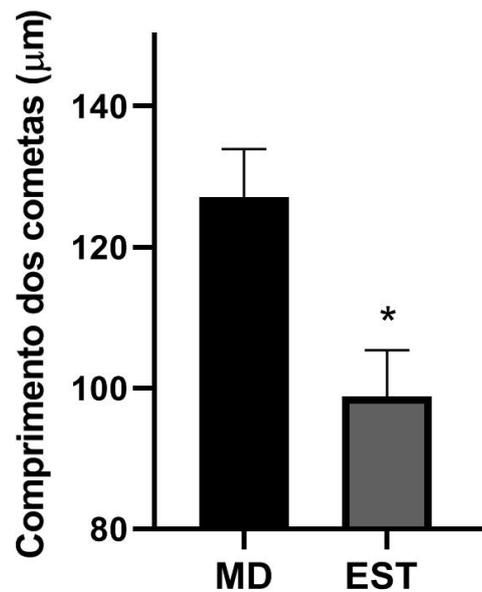


Diferença em relação ao grupo MD. Normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk, seguido do teste estatístico *t Student*. Grupo MD: 5 animais; Grupo EST: 6 animais.

Figura 5. Concentrações hepáticas de (i): ácido caprílico e (ii): ácido butírico no tecido hepático em ratos submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

4.7. Ensaio do cometa neutro

Na **Figura 6** é possível observar que os animais que receberam o tratamento com lipídios estruturados apresentaram cometas de comprimentos menores ($p < 0,05$), quando comparados aos animais que receberam maltodextrina.



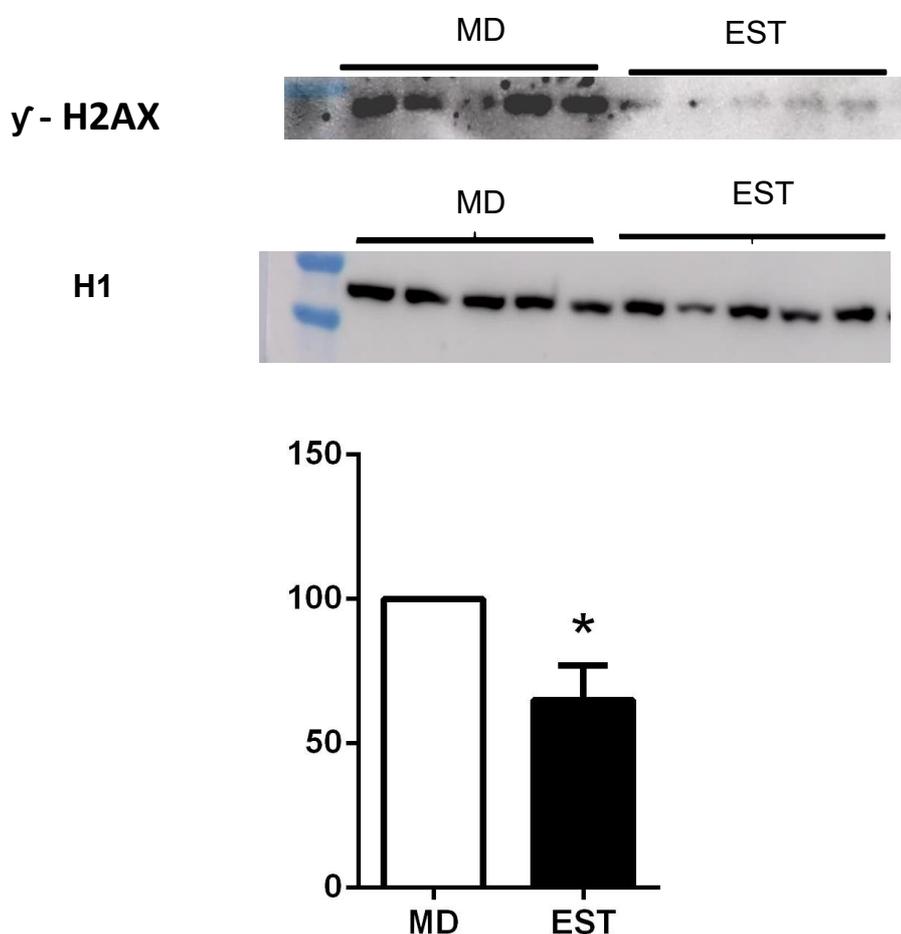
* Diferença em relação ao grupo MD. Normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk, seguido do teste estatístico t *Student*. Grupo MD: 5 animais; Grupo EST: 5 animais.

Figura 6. Média do comprimento dos cometas em µm dos fígados dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese.

4.8. Westen blot do fígado dos animais

4.8.1. Quantificação da histona γ -H2AX

Com o objetivo de avaliar a ação dos lipídios estruturados na diminuição dos danos no DNA, foi feita a marcação por western blot da histona γ -H2AX. Na **Figura 7** é possível observar que os animais que receberam o tratamento com lipídios estruturados, apresentaram menores níveis de γ -H2AX ($p < 0,05$), quando comparados aos animais que receberam maltodextrina.

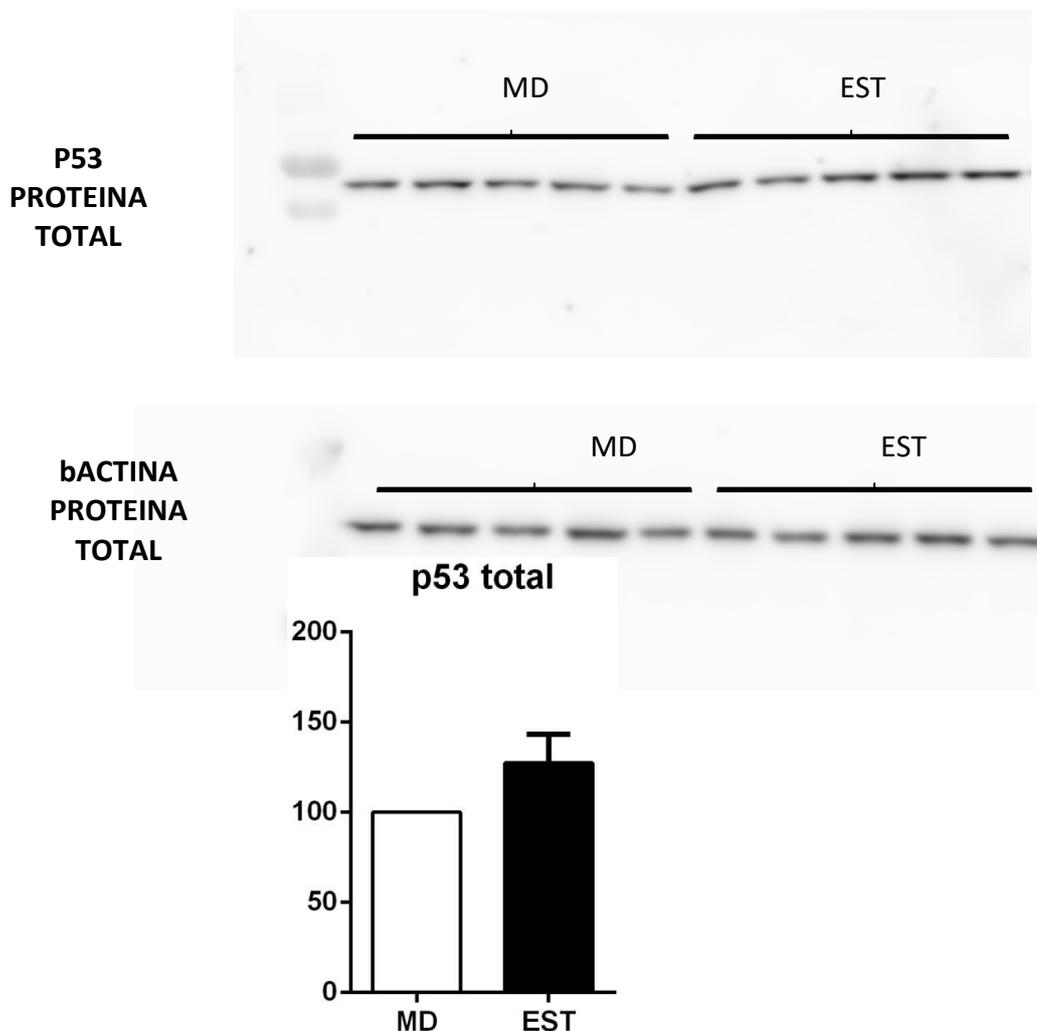


* Diferença em relação ao grupo MD. Normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk, seguido do teste estatístico *t Student*. Grupo MD: 5 animais; Grupo EST: 5 animais.

Figura 7. Quantificação de γ -H2AX dos fígados dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese. Maltodextrina (MD); Lipídios Estruturados (EST).

4.8.2. Quantificação da proteína p53 total

Na **Figura 8** observa-se a marcação da quantidade total de p53 por western blot. Houve um aumento de 27% de p53 no grupo tratado com lipídios estruturados, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

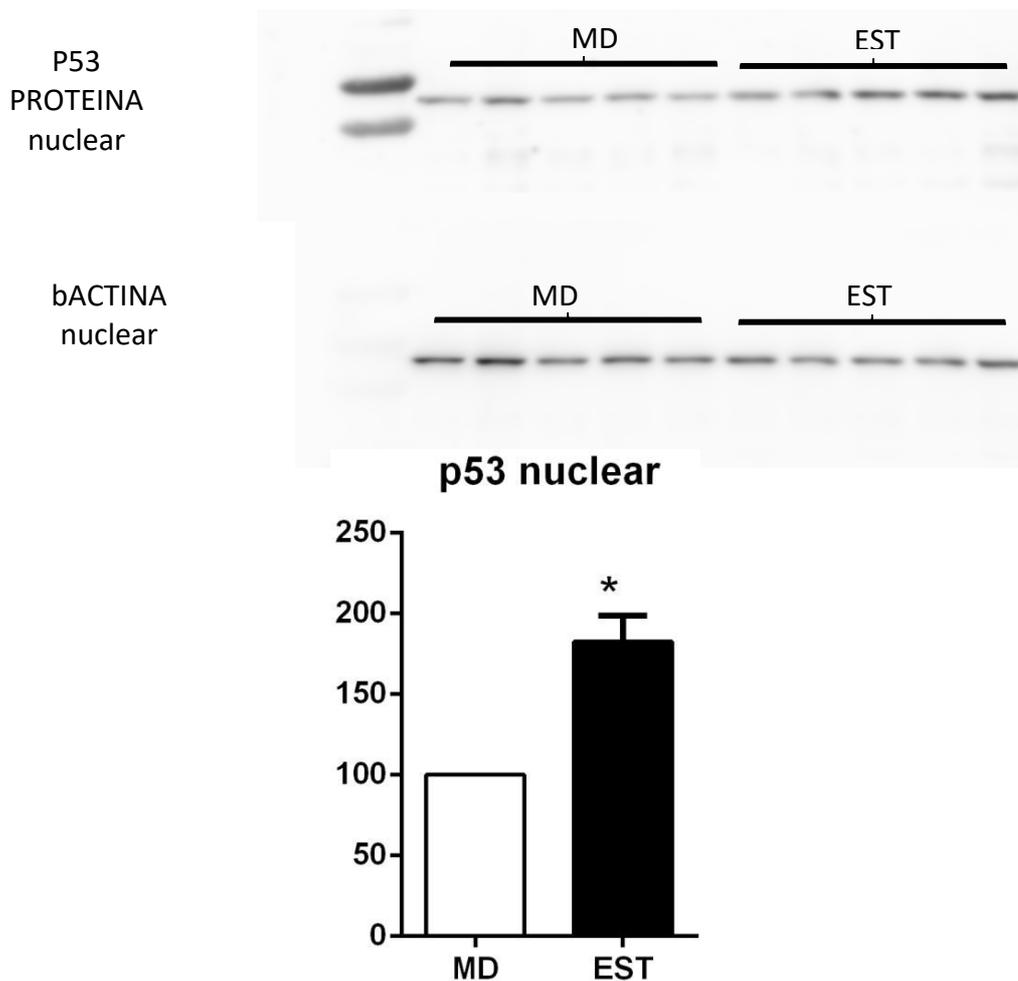


Normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk, seguido do teste estatístico *t Student*.

Figura 8. níveis de p53 dos fígados dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese. Maltodextrina (MD); Lipídios Estruturados (EST). Grupo MD: 5 animais; Grupo EST: 5 animais.

4.8.3. Quantificação da proteína p53 nuclear

A localização nuclear da proteína p53 envolve sua ação em diversas vias relacionadas com mecanismos quimiopreventivos. Na **figura 9**, os animais do grupo tratado com lipídios estruturados apresentaram um aumento de 82% na concentração de p53 nuclear ($p < 0,01$) quando comparados com os animais tratados com maltodextrina.



** Diferença em relação ao grupo MD. Normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk, seguido do teste estatístico *t Student*.

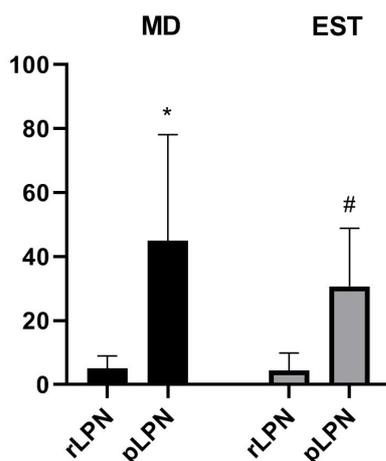
Figura 9. níveis de p53 nuclear nos fígados dos animais submetidos ao modelo do RH e tratados com maltodextrina (MD) ou lipídios estruturados (EST) na etapa de promoção da hepatocarcinogênese. Maltodextrina (MD); Lipídios Estruturados (EST). Grupo MD: 5 animais; Grupo EST: 5 animais.

4.9. Avaliação da proteína p53 citoplasmática por imunistoquímica

De acordo com a **tabela 6**, é possível observar que em ambos os grupos tratados, notou-se maior ($p < 0,05$) percentagem de LPN persistentes marcadas no citoplasma para p53 quando comparado com LPN em remodelação. No grupo MD, 45% das LPN p53 positivas são persistentes, enquanto 5% são LPN em remodelação. Já no grupo estruturado, 30% representam LPN persistentes positivas para p53, enquanto 4,4% representam LPN em remodelação. Não foram observadas marcações nas células adjacentes as lesões (*surrounding*) e nem no animal não submetido ao modelo do hepatócito resistente.

Tabela 6. Porcentagem (%) de LPN persistentes e em remodelação com marcação imunistoquímica de p53 citoplasmática, em ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente, tratados com maltodextrina (MD) e lipídios estruturados (EST).

Grupos (n)	% de pLPN p53 ⁺	% de rLPN p53 ⁺
MD (5)	45 ± 24,9	5,0 ± 3,9
EST (6)	30,7 ± 18,2	4,4 ± 5,5



* Diferença entre pLPN e rLPN no grupo MD. # Diferença entre pLPN e rLPN no grupo EST. Normalização dos dados testada pelo teste Shapiro – Wilk, seguido do teste estatístico *t Student*.

5. Discussão

Uma vez que o HCC apresenta mau prognóstico por ser diagnosticado em fase avançada, torna-se necessária a busca por novos agentes quimiopreventivos. A tributirina apresenta efeitos positivos na quimioprevenção da hepatocarcinogênese, visto que esta é responsável pela indução da apoptose e modulação de mecanismos epigenéticos, atuando como um forte inibidor das enzimas desacetilases de histonas (HDACis) (KUROIWA – TRZMIELINA, 2009; DE CONTI et al., 2012; SHARMA, TOLLEFSBOL, 2022). A combinação de compostos bioativos pode fornecer inúmeras vantagens no que tange a quimioprevenção, como o aumento da eficácia e biodisponibilidade de determinada substância. Essas propriedades são esperadas com os lipídios estruturados obtidos a partir da interesterificação da tributirina com a tricaprilina.

Tendo em vista estudos do grupo que demonstram atividade quimiopreventiva da tributirina, a reação de interesterificação para a obtenção dos EST foi direcionada para que a maior parte dos lipídios estruturados formados fosse tal que, quando hidrolisados fornecessem moléculas de ácido butírico e ácido caprílico na proporção 2:1 (KUROIWA – TRZMIELINA, 2009; DE CONTI et al., 2012; HEIDOR et al., 2014). A reação teve como produto diferentes triacilgliceróis, sendo eles: BBC/BCB triacilgliceróis compostos por dois ácidos butíricos e um ácido caprílico; CCB/CBC triacilgliceróis compostos por dois ácidos caprílicos e um ácido butírico. Dado o direcionamento da reação, foi observada uma proporção maior na formação de triacilgliceróis do tipo BBC/BCB em relação ao BCC/CBC. Além disso, a presença elevada de BBB pode estar relacionada com o excesso de tributirina adicionada para potencializar a reação, assim como com a ineficiência da enzima na hidrólise do triacilglicerol. Tanto a tributirina como a tricaprilina apresentaram em sua composição somente ácido butírico e ácido caprílico, respectivamente.

Não foram observadas diferenças entre os grupos tratados em relação à evolução do peso corporal dos animais, nem ao peso hepático relativo no final do experimento, confirmando que não houve efeitos deletérios prejudiciais à

saúde, e nem toxicidade pela administração das dosagens utilizadas dos tratamentos. Além disso, a ausência de variação nos pesos indica que a maltodextrina atua como um adequado controle isocalórico (de CONTI et al., 2012; HEIDOR et al., 2014).

Em relação à análise das lesões pré neoplásicas, o grupo tratado com lipídios estruturados mostrou atividade quimiopreventiva, uma vez que apresentou redução no número de lesões em remodelação e total GSTP-P+, quando comparado com o grupo MD. Uma das hipóteses para tais achados é o aumento nas concentrações de AB no fígado destes animais. Kuroiwa-trzmielina e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento com tributirina (200mg/100g de p.c), administrado na fase de iniciação e promoção resultou em menor área de pLPN no grupo tratado quando comparado ao grupo controle. Apesar da ausência de diferença estatística, a porcentagem de área ocupada por pLPN e total GST-P+ foi menor no grupo EST quando comparado ao grupo MD. A ausência de diferenças estatísticas significativas pode estar relacionada com o alto desvio padrão entre os animais, devido ao número reduzido de amostras, em decorrência da exacerbada mortalidade durante a aplicação do modelo RH. Por outro lado, a utilização de animais isogênicos com uniformidade fenotípica e genotípica, como os *Rattus norvegicus Fischer 344*, possui grandes vantagens experimentais, que permite a redução do número de animais nos experimentos.

A morte dos animais ocorreu, em geral, minutos após a hepatectomia. Estes apresentavam respiração não aprofundada, indicando que a metabolização de ambos, analgésico metadona (administrado 10 minutos antes da cirurgia) e anestésico isoflurano, estava comprometida. Isso pode estar relacionado com o metabolismo destes fármacos, que ocorre no fígado por meio da via metabólica envolvendo as enzimas do sistema citocromo P450 (YOUNIS et al., 2019; SAFARI et al., 2015; MANGÓ et al., 2022). A metadona é metabolizada principalmente no fígado; a etapa principal consiste na N-desmetilação pelas CYP3A4, CYP2D6 e CYP1A2. Já o isoflurano é metabolizado pela enzima CYP2E1 a um intermediário reativo trifluoroacetilado (TFA) (FERRARI et al., 2004; LIVERTOX, 2018). Deste modo, uma hipótese é

que o fígado remanescente após a hepatectomia parcial a 70% comprometido pela administração da DEN e 2-AAF, não foi capaz de suprir as necessidades de metabolização concomitante do analgésico e anestésico.

Durante a hepatocarcinogênese, as células neoplásicas sofrem um aumento na taxa de proliferação celular e apoptose quando comparadas com as células não-neoplásicas (*surrounding*) (GRASL-KRAUPP et al., 1997). Essa informação é apoiada por diversos trabalhos do grupo (ESPÍNDOLA et al., 2005; ONG et al., 2006; KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2011). No presente estudo, a avaliação do índice de proliferação celular resultou em diferenças estatísticas entre o *surrounding* do mesmo grupo em ambos os tipos de lesões. Por outro lado, apesar do grupo tratado com EST ter apresentado uma maior porcentagem de corpúsculos apoptóticos em comparação ao *surrounding* do mesmo grupo tanto em pLPN, como nas rLPN, não houve diferença estatística. Vale ressaltar que, estudos do grupo mostraram indução da apoptose pela administração de tributirina em modelos *in vivo* nas fases iniciais da hepatocarcinogênese (KUROIWA – TRZMIELINA, 2009; DE CONTI et al., 2012) e, além disso, o estudo *in vitro* realizado por NARAYANAN e colaboradores (2015) mostra atividade antineoplásica por meio da indução da apoptose em células neoplásicas tratadas com ácido caprílico.

As ações quimiopreventivas do ácido butírico já são bem descritas na literatura, porém, devido as suas características farmacocinéticas, a sua administração oral torna-se limitada. Estudos demonstram que a tributirina, pró-farmaco do ácido butírico, fornece concentrações significativas de AB no fígado, capazes de exercer sua função antineoplásica (KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009; de CONTI et al., 2011; NA, SEOK, HA, 2021). Para confirmar tais dados, foi realizada a quantificação de AB e AC no fígado dos grupos tratados e, como esperado, o grupo EST apresentou maior ($p < 0,05$) concentração de AC e AB por grama de tecido hepático em relação ao grupo controle MD. Nos grupos tratados a maior concentração de AB quando comparada com a concentração de AC pode ser resultado da fermentação de fibras dietéticas pelas bactérias colônicas do intestino, que tem como um dos produtos finais o butirato.

Por outro lado, a ação do ácido caprílico no processo da hepatocarcinogênese permanece desconhecida. A literatura carece de informações neste sentido. Em um estudo *in vitro* com ácidos graxos de cadeia média, o AC demonstrou atividade antineoplásica significativa em células humanas de câncer colorretal, de pele e de mama (NARAYANAN et al., 2015). O AC também demonstrou atividade em tumores gliais de alto grau (HGGs) e glioblastoma multiforme (GBM), os quais estão entre os cânceres mais malignos conhecidos. Durante a terapia metabólica cetogênica clássica, a utilização de AC pode fortalecer as ações antitumorais e reduzir a toxicidade sistêmica pela programação diferencial das vias mitocondriais e outras vias metabólicas (ALTINOZ, OZPINAR, SEYFRIED, 2020; DAMIANO et al., 2020). Até o momento não foram encontrados estudos publicados que avaliem *in vivo* as suas ações observadas *in vitro*.

Danos no DNA ocorrem quando o reparo da cromatina é incompleto ou impossível de ser realizado, sendo originado, muitas vezes, pela presença de substâncias pró-oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) (SUROVA; ZHIVOTOVSKY, 2013; JI et al., 2022). A presença de ROS é capaz de modificar biomoléculas como o DNA, podendo causar mutações em genes importantes tais como supressores de tumor e/ou proto-oncogenes e assim estimular a formação de neoplasias (HEIDOR, et al., 2014; NI et al., 2019; ZHANG et al, 2022). Sob condições fisiológicas, os níveis de ROS são rigidamente controlados para manter a homeostase celular normal e as funções biológicas essenciais pela ação de enzimas antioxidantes. Já na presença de danos, os mecanismos de reparo são determinados por diferentes vias de sinalização, como por exemplo a via de resposta ao dano no DNA (DDR). DDR é uma cascata de transdução de sinal homeostática que ativa as vias de reparo do DNA em resposta a vários tipos de danos (NI et al., 2019). Com isso, no presente estudo, optou-se por usar o ensaio do cometa na sua versão neutra, pois ele permite a análise da quebra das fitas simples e dupla do DNA, que é sempre seguida pela fosforilação da histona H2AX (ABRAMENKOV et al., 2022).

Como resultado, observou-se comprimentos de cometas menores no

fígado dos animais do grupo EST, o que pode estar relacionado com ação dos lipídios estruturados na redução de danos no DNA. O estudo realizado com ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com lipídios estruturados obtidos a partir da tributirina e óleo de linhaça, mostrou redução no comprimento dos cometas nas amostras de fígado do grupo tratado. Os autores sugerem que esse resultado pode ser devido ao aumento da expressão de enzimas antioxidantes e maior eficiência no processo de reparo do DNA devido a presença do ácido butírico em sua estrutura (ORTEGA et al., 2021).

A proteína Ataxia-telangiectasia mutada (ATM) está diretamente associada ao mecanismo celular de resposta a lesões. A ATM exerce sua função atuando nas proteínas-chave do ciclo celular que são induzidas em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo o estresse oxidativo, por meio da fosforilação de seus alvos, como por exemplo a fosforilação da histona H2AX. Os sinais iniciados por γ -H2AX e outros sensores são transmitidos para proteínas transdutoras, como a quinase Chk2, as quais regulam várias moléculas efetoras, como por exemplo a proteína supressora de tumor p53 (NI et al., 2019).

A variante histona H2AX é um componente essencial do nucleossomo responsável por iniciar as etapas do processo de reparo do DNA, mantendo a estabilidade genômica através da iniciação de uma cascata de sinalização que atua coletivamente para promover o reparo da quebra da fita dupla do DNA (LIU et al., 2022). A γ -H2AX tem sido considerada um indicador adequado para avaliar danos no DNA (SCHUTZ, STOPE, BEKESCHUS, 2021). No presente estudo, além da redução no comprimento dos cometas, o grupo tratado com lipídios estruturados apresentou níveis menores da histona H2AX na sua forma fosforilada (γ -H2AX), quando comparado ao grupo controle. Essa diminuição pode ser atribuída a administração dos EST, sugerindo que o tratamento apresentou diminuição na produção de substâncias pró-oxidantes ou maior eficiência no processo de reparo do DNA.

Os inibidores de enzimas desacetilases de histonas (HDACis), como o ácido butírico, exibem efeitos antiproliferativos seletivos em células

geneticamente danificadas e podem aumentar a sensibilidade das células neoplásicas a agentes genotóxicos. Usando o ensaio do cometa, bem como a marcação de γ H2AX, o estudo realizado por GNEDINA e colaboradores (2022) mostrou que o butirato de sódio inibiu o reparo da quebra de fita dupla do DNA (DSB) em células alteradas, mas não em células normais. A não ação dos HDACs em células normais apresentou as vantagens de HDACs em terapia de combinação com agentes genotóxicos para aumentar seletivamente sua atividade citotóxica em células neoplásicas.

TAKAI e colaboradores (2004) demonstraram a partir da avaliação de seis linhagens de células de câncer endometrial que os inibidores de HDAC (HDACIs), como o butirato de sódio, inibem a proliferação de células neoplásicas, estimula a apoptose e induz a parada do ciclo celular. Os resultados obtidos pelo grupo sugerem que os HDACIs são eficazes na inibição do crescimento de células de câncer endometrial *in vitro* e em camundongos nude, sem efeitos colaterais tóxicos. Essa descoberta impacta na possibilidade de que os HDACIs possam ser particularmente eficazes no tratamento de câncer de endométrio.

Diversos estudos já verificaram atividades de diferentes compostos bioativos relacionadas à proteção contra danos no DNA. A Theabrownin, um componente bioativo do chá verde, é conhecida por melhorar o metabolismo lipídico e reduzir o nível de colesterol do fígado. O estudo realizado por Xu e colaboradores (2021) revelou que a Theabrownin exibiu efeitos inibitórios significativos nas células SK-Hep-1, HepG2 e Huh7 de HCC. Os achados demonstraram que a TB suprimiu significativamente o crescimento do tumor nas células SKHep-1, além de induzir a senescência celular e apoptose através da ativação pela fosforilação da cascata ATM-H2AX-Chk2-p53. Outro estudo realizado por Kim e colaboradores (2022) avaliou a redução de danos no DNA pela administração do composto natural Pentagalloylglicose (PGG) em células de câncer de pulmão resistentes à cisplatina. Os autores concluíram que a PGG induziu a apoptose por meio da regulação positiva das proteínas γ -H2AX, pCHK2 e p53.

Com o objetivo de avaliar características biológicas de dois extratos enriquecidos com polifenóis em células endoteliais da veia umbilical humana expostas a condições hiperglicêmicas, Lelciu e colaboradores (2021) avaliou a quantificação do estresse oxidativo e expressões de NF- κ B, pNF- κ B, HIF-1 α e γ -H2AX. Os resultados mostraram que a exposição à hiperglicemia induziu o estresse oxidativo e conseqüentemente lesões no DNA. Os extratos enriquecidos com polifenóis demonstraram uma redução significativa do estresse oxidativo e da formação de γ -H2AX, sugerindo seu papel protetor nas células endoteliais na hiperglicemia.

A shiconina, um fitoterápico chinês (raiz seca de *Lithospermum erythrorhizon*), pode inibir a atividade celular, induzir o dano oxidativo e promover a senescência celular de células neoplásicas por meio da ativação da via de sinalização p53/p21. Com o objetivo de investigar a ação desse composto no câncer de pulmão, os autores utilizaram células de adenocarcinoma do pulmão, cultivadas por 12 h, 24 h e 48 h com diferentes concentrações de shiconina (0 μ m, 2 μ m e 4 μ m), respectivamente. Os níveis de expressão das proteínas p-H2AX, p53 e p21 foram avaliados. Como resultado, os pesquisadores observaram que os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os níveis de expressão de p-H2AX, p53 e p21 aumentaram significativamente ($p < 0,05$) conforme o aumento da concentração do fitoterápico (LIWEN et al., 2022).

Um dos mecanismos envolvidos na proteção contra danos no DNA ocorre por meio da proteína p53, a qual é responsável pela ativação de centenas de genes envolvidos nesse processo (PARRALES, IWAKUMA, 2015; WANG et al., 2022). Estudos realizados pelo nosso grupo indicam que a tributirina atua na retenção de P53 no núcleo (ORTEGA et al., 2016). Uma vez que a localização da P53 está relacionada com a sua função biológica, a presença desta no núcleo potencializa o desempenho de sua função como guardião do genoma (O'BRATE, GIANNAKAKOU, 2003; KONG et al., 2022).

Em condições normais, a proteína p53 está em concentrações não detectáveis no núcleo, uma vez que sua regulação está relacionada a sua degradação citoplasmática. A sua presença no núcleo acontece devido a

resposta ao estresse celular (KULEAPE et al., 2022). Os resultados obtidos neste experimento mostraram níveis maiores desta proteína no núcleo do grupo tratado com lipídios estruturados, o que indica que o tratamento com EST pode estar atuando na translocação da proteína frente ao dano que os animais foram expostos. A regulação da p53 é necessária para a resposta adequada ao tipo de estresse e é mediada por modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação, acetilação, entre outras. Com isso, a presença da p53 no núcleo no presente estudo pode estar relacionada com mecanismos epigenéticos em virtude da ação da administração dos ESTs (ORTEGA et al., 2016; HERNÁNDEZ BORRERO, EL-DEIRY, 2021).

Estudos mostram que a combinação entre inibidores de HDACs amplifica a atividade antitumoral possivelmente induzindo hiperacetilação de p53, sugerindo que o tratamento com este tipo de combinação pode ser uma estratégia eficaz (PALANI, BECK, SONNEMANN, 2012; TOMICIC, DAWOOD, EFFERT, 2021). Um estudo investigou a eficácia *in vivo* do butirato de sódio e da tributirina administrados via oral, na inibição do crescimento do câncer de próstata. Os autores demonstraram uma ação efetiva por parte dos inibidores de HDACs no câncer de próstata humano por meio da inibição do crescimento celular e mecanismos pró-apoptóticos. Os resultados apresentados fornecem informações importantes para a aplicação dessas substâncias em ensaios clínicos bem controlados em pacientes com alto risco de recorrência após terapia específica ou em pacientes com câncer de próstata avançado (KUEFER et al., 2004).

Um estudo realizado com o knockdown da peroxirredoxina-5 (Prdx5), uma enzima antioxidante citoprotetora que inibe o acúmulo de peróxido endógeno ou exógeno, resultou em aumento da acetilação de p53 nos resíduos K379 e K382, aumentando a estabilidade de p53 no núcleo e o desempenho de suas funções. A ativação de p53 por acetilação sugere que a sua desacetilação pode desempenhar um papel vital na regulação negativa da atividade da proteína (REED, QUELLE, 2014). No entanto, outro estudo realizado com células neuronais, mostrou que a acetilação de p53 nos resíduos K381 e K382 inibiu especificamente a morte celular induzida por danos no DNA mediada por p53,

sugerindo que a acetilação da proteína p53 depende do contexto e do tipo de célula (AGBORBESONG et al., 2022).

As proteínas de transporte nuclear, importinas e exportinas, podem desempenhar um papel importante no câncer (MAHIPAL, MALAFA, 2016). Elas atuam na localização subcelular de moléculas críticas, como a proteína p53, por meio do transporte nucleocitoplasmático (MEHMOOD et al., 2021). Estes processos intracelulares implicam em vários cenários dentro da célula, incluindo motilidade celular, regulação do ciclo celular e apoptose, contribuindo no processo da carcinogênese. Em cânceres de ovário, cervical, pancreático, pulmão, gástrico, carcinoma hepatocelular e mama, foi detectado um aumento no nível de expressão da proteína exportina e foi relatado que esse aumento foi associado a metástase, aumento do tamanho do tumor, grau histológico e diminuição da sobrevida global (KIM, MORDOVKINA, SOROKIN, 2022). O estudo realizado por Ortega e colaboradores (2016) mostrou que tanto ratos submetidos ao modelo do hepatócito resistente e tratados com tributirina durante a fase de promoção, quanto células de HCC de rato e humano tratadas com butirato de sódio, demonstraram redução na interação entre a ligação da exportina CRM1 e proteína p53. Isso pode resultar em um acúmulo nuclear da proteína p53 e aumento das suas funções antineoplásicas.

A inativação da proteína p53 é uma das características mais comuns em cânceres humanos. Um dos mecanismos envolvidos é a inativação da proteína quando mantida no citoplasma. Assim, p53 não pode se deslocar livremente para o núcleo para realizar suas funções supressoras de tumor como fator de transcrição (ELWAKEEL, 2022). Os resultados referentes a imunistoquímica da p53 demonstraram um acúmulo da proteína no citoplasma dos hepatócitos nas lesões pré neoplásicas, principalmente nas lesões persistentes, mas não nas células adjacentes (*surrounding*). Este dado vai ao encontro dos resultados obtidos pelo grupo anteriormente (MAZZANTINI, de CONTI, MORENO, 2008; KUROIWA-TRZMIELINA et al., 2009) Este acúmulo pode estar relacionado com a condição patológica das lesões, uma vez que em ambos os grupos há uma presença maior nas lesões persistentes, as quais estão relacionadas com a progressão da doença. Com isso, sugere-se que essa característica pode estar

envolvida com a perda da função da proteína p53 decorrente do seu acúmulo no citoplasma. O mascaramento de sinais de importação ou exportação nuclear, seja por mudanças na conformação de tetrâmero da proteína ou pela ligação a outra proteína, fornece um mecanismo rápido e eficiente para prevenir o reconhecimento do sinal pela maquinaria de transporte nuclear. Uma hipótese é que o transporte nuclear-citoplasmático de p53 pode ser regulado por diferentes modificações, entre elas modificações epigenéticas. A sua ligação com outros fatores pode dificultar sua marcação nuclear. Além da p53, é possível que outros supressores tumorais também sejam sequestrados no citoplasma por associação com parceiros de ligação (FABBRO; HENDERSON, 2003). Apesar de não significativa, a diminuição da p53 citoplasmática tanto nas pLPN quanto nas rLPN podem estar associadas a estabilização da proteína no núcleo devido a administração dos lipídios estruturados, uma vez que o ácido butírico possui ação neste contexto.

Os estudos apresentados e discutidos até o momento corroboram com os resultados obtidos nessa pesquisa, uma vez que os danos no DNA são eventos importantes durante o processo da carcinogênese. As atividades quimiopreventivas observadas podem estar relacionadas tanto com as concentrações hepáticas observadas no grupo tratado com lipídios estruturados de ácido butírico, que possui ações quimiopreventivas bem estabelecidas na literatura, inclusive com mecanismos envolvendo o reparo do DNA, quanto com as concentrações hepáticas de ácido caprílico. Em relação ao AC, um estudo anterior do nosso grupo no qual somente a tricaprilina foi administrada em animais durante as fases de iniciação e promoção da hepatocarcinogênese, mostrou atividades quimiopreventivas *in vivo* pela ação do ácido caprílico (dados não publicados).

A estruturação a partir da tributirina e tricaprilina resultou em um lipídio estruturado inovador com ações quimiopreventivas na fase de promoção da hepatocarcinogênese experimental. O aumento nas concentrações hepáticas de ácido butírico e ácido caprílico no fígado dos animais tratados com EST resultou na minimização dos danos no DNA. A diminuição da γ -h2AX indica que há uma diminuição na formação de danos no DNA, possivelmente pela diminuição do

estresse oxidativo por meio da ação do ácido butírico e, talvez, do ácido caprílico, como substâncias antioxidantes. Paralelo a isso, o estudo mostrou acúmulo da proteína p53 no núcleo, que pode estar relacionado com mecanismos epigenéticos, como a acetilação, que estabiliza a proteína no núcleo e faz com que ela desempenhe seu papel como guardião do genoma, induzindo a parada do ciclo celular de células neoplásicas, por exemplo. Apesar de não significativa, a diminuição da p53 nas pLPN no grupo EST avaliado por imunohistoquímica pode ser um indicativo de que a proteína p53 está mais no núcleo devido a administração dos EST, seja pela acetilação da proteína, ou por mecanismos envolvendo as proteínas importina e exportina, uma vez que há dados na literatura mostrando a ação do ácido butírico neste contexto. Estes são mecanismos importantes a serem elucidados, uma vez que a falta de reparo no DNA danificado contribui com o processo da carcinogênese, diminuindo a manutenção da estabilidade genômica e resultando na progressão do câncer.

6. Conclusão

Lipídios estruturados produzidos por interesterificação enzimática da TB com TC exercem atividade quimiopreventiva modulando vias relacionadas ao reparo do DNA em ratos *Fischer-344* tratados durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese. Tais achados são sustentados pela atuação dos EST em mecanismos envolvendo a proteína p53 e sua presença no núcleo, onde desenvolve sua função como protetora do genoma. Este achado é apoiado pela diminuição dos danos no ensaio do cometa neutro, aumento dos níveis da proteína p53 no núcleo e diminuição da fosforilação da H2AX, um importante marcador de lesões no DNA.

7. Referências

AGBORBESONG E., et al. Prdx5 regulates DNA damage response through autophagy-dependent Sirt2-p53 axis. **Hum Mol Genet.** 2022.

ANAND P., et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharm Res.**; v.25, n.2200, 2008.

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

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

ALTINOZ M.; OZPINAR A.; SEYFRIEDT N. Caprylic (Octanoic) Acid as a Potential Fatty Acid Chemotherapeutic for Glioblastoma. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** v.159, n. 102-142. 2020.

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

AUNGST, B. Absorption enhancers: applications and advances. **J. AAPS**, v. 14, n.10- 18, 2012.

BAENA R.; SALINAS P. Diet and cancer: risk factors and epidemiological evidence. **Maturitas**, v.77; n.202–208, 2014.

BAMIA C., Et al. Fruit and vegetable consumption in relation to hepatocellular carcinoma in a multi-centre, European cohort study. **Br. J. Cancer.** V.112 ; n.1273–1282. 2015.

BARBISAN, L. 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 ; n.295 - 308, 2003.

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

BARROSO S., AGUILERA A. Detection of DNA Double-Strand Breaks by γ -H2AX Immunodetection. **Methods Mol Biol.** v.2153 ; n.1-8. 2021.

BAYAZID A.B., et al. Neuroprotective Effects of Sodium Butyrate through Suppressing Neuroinflammation and Modulating Antioxidant Enzymes. **Neurochem Res.** v.9; n. 2348-2358. 2021.

BERTUCCIO P., et al. Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality. **Journal of Hepatology.** v.67; n.302-309. 2017.

BEAUVIEUX, M., et al. Butyrate impairs energy metabolism in isolated perfused liver of fed rats. **J. Nutr.**, v.131, n.1986-1992, 2001.

BOHN S., et al. Coffee and cancer risk, epidemio-logical evidence, and molecular mechanisms, **Mol. Nutr. Food Res.** v.58 ; n.915 – 930, 2014.

BRAY 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.** n.394 - 424. 2018.

BRAYDEN J. et al. Systemic delivery of peptides by the oral route: Formulation and medicinal chemistry approaches. **Adv Drug Deliv Rev.** v.157 ; n.2-36. 2020.

BRAYDEN J.; STUETTGEN V. Sodium glycodeoxycholate and sodium deoxycholate as epithelial permeation enhancers: in vitro and ex vivo intestinal and buccal bioassays. **Eur J Pharm Sci.** v.159 ; n.105737, 2021.

BRAVI F. et al. Coffee reduces risk for hepatocellular carcinoma: an updated meta-analysis. **Clin Gastroenterol Hepatol.** v.11 ; n.1413-1421, 2013.

BUKLEY A.; TURNER R. Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v.10 ; n.029314, 2018.

CABALLERO, E., et al. Potential use of avocado oil on structured lipids MLM-type production catalysed by commercial immobilized lipases. **PLoS One.** v.9; n.107749. 2014.

CARDOZO, T., et al. Chemopreventive effects of β -ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. **J. Nutr. Biochem.** v.22 ; n.130-135. 2011.

CASTRO, F.; MENDES, A.; SANTOS, J. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quim. Nova,** v.27; n.146 - 156, 2004.

CHAGAS C. et al. Farnesol inhibits cell proliferation and induces apoptosis after partial hepatectomy in rats. **Acta Cir Bras**. v.24 ; n.377-82, 2009.

CHAGAS C. et al. Folic acid supplementation during early hepatocarcinogenesis: cellular and molecular effects, **Int. J. Cancer**. v.129 ; n.2073 – 2082, 2011.

CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY S, FISHER P., SARKAR D. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. **Adv Cancer Res** v.149 ; n.1-61. 2021.

CLARK, L. et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with the skin: a randomized controlled trial. **Nutrition Prevention of Cancer Study Group. JAMA**, v. 276, n. 1957-63, 1996.

CUMMINGS J. et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut**. v.28 ; n.1221-1227, 1987.

CUMMINGS, J. Short chain fatty acids in human colon. **Gut**. v.22 ; n.763-779, 1981.

DAGLI M.L et al. Beta-carotene reduces the ductular (oval) cell reaction in the liver of Wistar rats submitted to the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. **Pathology**. v.30 ; n.259-66, 1998.

DAMIANO F, et al. Decanoic Acid and Not Octanoic Acid Stimulates Fatty Acid Synthesis in U87MG Glioblastoma Cells: A Metabolomics Study. **Front Neurosci**. v23; n.14:783, 2020.

DANIEL, P. et al. Pharmacokinetic study of butyric acid administered in vivo as sodium and arginine butyrate salts. **Clinic Chimica Acta**, v.181 ; n.255-263, 1989.

DANIELE, D. N. et al. Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. **Oncotarget**. v. 8. n. 8947 - 8979, 2017.

da SILVA, R. 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 ; n.23–28, 2012.

da SILVA, R.; GIOIELLI, L. Lipídios estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano. **Quím. Nova**. v.32 ; n.1253-1261, 2009.

DAVIE, J. R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **J. Nutr**, v. 133, n.248-293, 2003.

de CONTI A. et al. Butyrate-containing structured lipids inhibit RAC1 and epithelial-to-mesenchymal transition markers: a chemopreventive mechanism against hepatocarcinogenesis. **J Nutr Biochem**. v.86 ; n.108496, 2020.

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. **Journal of Nutritional Biochemistry**. n. 1 – 7. 2012.

de CONTI A. et al. The chemopreventive activity of the butyric acid prodrug tributyrin in experimental rat hepatocarcinogenesis is associated with p53 acetylation and activation of the p53 apoptotic signaling pathway, **Carcinogenesis**. v.34 ; n.1900–1906, 2013.

de FLORA S.; FERGUSON, L. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat. Res.**, v.591, n. 1-2. 2005.

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.1191-1308, 1981.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**. n.57–463. 2004.

ELWAKEEL A. Abrogating the Interaction Between p53 and Mortalin (Grp75/HSPA9/mtHsp70) for Cancer Therapy: The Story so far. **Front Cell Dev Biol**. 2022.

ESPÍNDOLA R. et al. Geranylgeraniol and beta-ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kappaB activation. **Carcinogenesis**. v.26 ; n.1091-1099, 2009.

FABBRO M, HENDERSON B. Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. **Exp Cell Res**. v.282, n.59-69. 2003.

FARBER E. Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G. H. A. Clowes memorial lecture. **Cancer Res**. v.44 ; n.5463-74, 1984.

FARBER E. Clonal adaptation during carcinogenesis **Biochem. Pharmacol.** v.39 ; n.1837-1846, 1990.

FARBER E., RUBIN H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. **Cancer Res**, v.51, n.11, p.2751-2761, 1991.

FARBER, E.; CAMERON, R. The sequential analysis of cancer development. **Adv. Cancer Res.** v.31 ; n.125–226, 1980.

FEDIRKO V. et al. Consumption of fish and meats and risk of hepatocellular carcinoma: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) **Ann. Oncol.**, v.24 ; n.2166–2173, 2013.

FELTES M. The production, benefits, and applications of monoacylglycerols and diacylglycerols of nutritional interest. **Food Bioprocess Technol.** v.6 ; n.17–35, 2012.

FERRARI A. et al. Methadone--metabolism, pharmacokinetics and interactions. **Pharmacol Res.** v.50; n.551-9. 2004.

FEO, F., et al. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. **Biochim. Biophys. Acta.** p.126-147. 2006.

FORNER, A. et al. Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. **Nat. Rev. Clin. Oncol.** p. 525 – 535. 2014.

FONSECA F. et al. All- trans and 9- cis retinoic acids, retinol and β - carotene chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve distinct actions on glutathione S- transferase positive preneoplastic lesions remodeling and DNA damage , **Carcinogenesis.** v.26 ; n.1940 – 1946, 2005.

FRAGKOS M, JURVANSUU J, BEARD P. H2AX is required for cell cycle arrest via the p53/p21 pathway. **Mol Cell Biol.** v.29; n.2828-40. 2009.

FURTADO K.S. et al. β -ionone modulates the expression of miRNAs and genes involved in the metastatic phenotype of microdissected persistent preneoplastic lesions in rats submitted to hepatocarcinogenesis. **Mol Carcinog.** v.56 ; n.184-196, 2017.

FU Y, CHUNG F. Oxidative stress and hepatocarcinogenesis. **Hepatoma Res.** v.4 ; n.39. 2018.

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.

GEORGE E.S. et al. The Association between Diet and Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. **Nutrients**. v.13 ; n.172. 2021.

GNEDINA O., et al. HDAC Inhibitor Sodium Butyrate Attenuates the DNA Repair in Transformed but Not in Normal Fibroblasts. **Int J Mol Sci**. v.23; n.3517. 2022.

GRASL-KRAUPP B. et al. Inherent increase of apoptosis in liver tumors: implications for carcinogenesis and tumor regression. **Hepatology**, v.25 ; n.906–912, 1997.

GUARIENTO A. 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.7 – 18, 2014.

GUNZEL D., FROMM M. Claudins and other tight junction proteins. **Compr Physiol**. v.2; n.1819-1852, 2012.

HAFNER A. et al. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v.4 ; n.199-210, 2019.

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

HEIDOR R. The chemopreventive activity of butyrate-containing structured lipids in experimental rat hepatocarcinogenesis. **Mol Nutr Food Res**. v.60 ; n.420-429, 2016.

HEIDOR, R., et al. The chemopreventive activity of the histone deacetylase inhibitor tributyrin in colon carcinogenesis involves the induction of apoptosis and reduction of DNA damage. **Toxicol. Appl. Pharmacol**. v.276 ; n.129-135, 2014.

HEINDRYCKX, F.; COLLE, I.; VLIERBERGHE, V. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. **Int J Exp Pathol**, v.90, n.4, p.367-386, 2009.

HERNANDÉZ L.; EL - DEIRY W. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**. 2021.

HIROSE M. et al. Effects of green tea catechins in a rat multi-organ carcinogenesis model, **Carcinogenesis** v.14 ; n.1549 – 1553, 1993.

HONG W., SPORN M. Recent advances in chemoprevention of cancer. **Science**. 5340 ; 1073-1077, 1997.

HUBER W., PARFEZALL W. Modification of N-acetyltransferases and glutathione S-transferases by coffee components: possible relevance for cancer risk. **Methods Enzymol**, v.401; n.307-341, 2005.

IARC. Latest global cancer data: cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. N. 263. Press Release; 2018.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Incidência de Câncer no Brasil, 2018. Disponível em: www.inca.gov.br.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Incidência de Câncer no Brasil, 2020. Disponível em: www.oncoguia.org.br.

IVASHKEVICH, A. et al. Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. **Cancer letters**. p. 123–133. 2012.

JANG S. et al. Lycopene inhibits Helicobacter pylori-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells. **Free Radic Biol Med**. v.3 ; n.607-615, 2012.

KAUFMANN R. et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits thrombin-induced hepatocellular carcinoma cell invasion and p42/p44-MAPKinase activation, **Oncol. Rep**. v.21 ; n.1261 – 1267, 2009.

KATSUTA et al. H2AX mRNA expression reflects DNA repair, cell proliferation, metastasis, and worse survival in breast cancer. **Am J Cancer Res**. 2022.

KOPP B, KHOURY L, AUDEBERT M. Validation of the γ H2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. **Arch Toxicol**. 2019.

KRUG S.M. et al. Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. **Biomaterials**. v.34 ; n.275-82, 2013.

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

KUNST C. et al. The p53 family in hepatocellular carcinoma. **Translational Cancer Research**. v.5. 2016.

KUO L., YANG L. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. **In Vivo**. p. 305 – 309. 2008.

KUO P., LIN C. Green tea constituent epigallocatechin- 3- gallate inhibits Hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53- dependent and Fas-mediated pathways, **J. Biomed. Sci**. v.10; n.219 – 227, 2003.

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

LAFARO K.; DEMIRJIAN A.; PAWLIK T. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. **Surg. Onco.I Clin. N. Am**. p.1-17. 2015.

LEE W., SHIM J., ZHU B. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids, **Mol. Pharmacol.**, v.68 ; n.1018– 1030, 2005.

LEE, K.; AKOH, C.; Structured lipids: Synthesis and applications. **J. Am. Oil Chem. Soc**. v.14; n.17-34, 1998.

LEVINE J.; OREN, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nat. Rev. Cancer**, v.9, p749-758, 2009.

LELCIU L., et al. Oxidative Stress and DNA Lesion Reduction of a Polyphenolic Enriched Extract of *Thymus marschallianus* Willd. in Endothelial Vascular Cells Exposed to Hyperglycemia. **Plants (Basel)**, 2021.

LIBBRECHT L., DESMET V., ROSKAMS T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. **Liver International**, v. 25, p16-27, 2005.

LI S. et al. Risk Factors, Pathogenesis, and Strategies for Hepatocellular Carcinoma Prevention: Emphasis on Secondary Prevention and Its Translational Challenges. **J Clin Med**. v.9 ; n.3817, 2020.

LIU Y., WANG L., HSU S. Modification of Epigenetic Histone Acetylation in Hepatocellular Carcinoma. **Cancers**. V.10, 2018.

LIU Y., TAVANA O, GU W. p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian. **J Mol Cell Biol.** v.11 ; n.564-577. 2019.

LIU Y., et al Histone H2AX promotes metastatic progression by preserving glycolysis via hexokinase-2. **Sci Rep.** 2022.

LUU H.N., et al. Quality diet indexes and risk of hepatocellular carcinoma: Findings from the Singapore Chinese Health Study. **Int J Cancer.** 2021.

LIVERTOX: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012. **Halogenated Anesthetics.** 2018.

LIWEN R, et al. Shikonin Induces Oxidative Damage and Promotes Cell Senescence in Lung Cancer Cells through p53/p21WAF Signaling Pathway. **Indian J Pharm Sci.** v.84, n.832-837.2004.

MA, L. et al. Epigenetics in hepatocellular carcinoma: an update and future therapy perspectives. **World J Gastroenterol.** P333–P345. 2014.

MANRIQUE D., GONZÁLEZ M. Ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico) y patologías intestinales [Short chain fatty acids (butyric acid) and intestinal diseases]. **Nutr Hosp.** v.34 ; n.58-61. 2017.

MARONGIU F., SERRA M., LACONI, E. Development versus Evolution in Cancer Biology. **Trends in Cancer,** 2019.

MARQUARDT, J.; ANDERSEN, J.; THORGEIRSSON, S. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. **Nature Publishing Group,** v. 15, n. 11, p. 653–667, 2015.

MATSUDA Y. et al. DNA damage sensor γ -H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma. **Scientific World Journal.** 2013.

MAXIMOV, G.; MAXIMOV, K. The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. **Biotechnology & Biotechnological Equipment.** v. 22, n. p. 664-668, 2008.

MAZZANTINI R., de CONTI A, MORENO F.. Persistent and remodeling hepatic preneoplastic lesions present differences in cell proliferation and apoptosis, as

well as in p53, Bcl-2 and NF-kappaB pathways. **J Cell Biochem.** v.103; n.538-46. 2009.

MCCARTHY, P. et al. Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. **Mutagenesis.** v.12 ; n.209 – 214, 1997.

MCCARTNEY, F., et al. Safety concerns over the use of intestinal permeation enhancers: A mini-review. **Tissue Barriers.** 2016.

MELMED S. et al. Safety and efficacy of oral octreotide in acromegaly: results of a multicenter phase III trial. **J Clin Endocrinol Metab.** v.100 ; n.1699–708, 2015.

MENTELLA M.C et al. Cancer and Mediterranean Diet: A Review. **Nutrients.** v.9 ; n.2059, 2019.

MIRANDA M. et al. β -ionone inhibits nonalcoholic fatty liver disease and its association with hepatocarcinogenesis in male Wistar rats. **Chem Biol Interact.** v.308 ; n.377-384, 2019.

MITTAL, S., EI-SERAG, H. B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the Population. **J Clin Gastroenterol.** 2013.

MOREIRA D. et al. Synthesis and characterization of structured lipid rich in behenic acid by enzymatic interesterification. **Food and Bioproducts Processing.** v.122 ; n.303-310, 2020.

MORENO F. et al. A comparison of beta-carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. **Int J Vitam Nutr Res.** v.65 ; n.87-94, 1995.

MORENO F. et al. Inhibitory effects of beta-carotene and vitamin a during the progression phase of hepatocarcinogenesis involve inhibition of cell proliferation but not alterations in DNA methylation. **Nutr Cancer.** v.44 ; n.80-88, 2002.

MORENO F. et al. Inhibitory effects of beta-carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. **Carcinogenesis.**v.12 ; n.1817-22, 1991.

MORENO F. et al. Lutein presents suppressing but not blocking chemopreventive activity during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis and this involves inhibition of DNA damage. **Chem Biol Interact.** v.168 ; n.221-228, 2007.

NARAYANAN, A., et al. Anticarcinogenic properties of medium chain fatty acids on human colorectal, skin and breast cancer cells in vitro. **Int. J. Mol. Sci.** n.5014-5027, 2015.

NAVES M. et al. Effects of beta-carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat(1). **J Nutr Biochem.** v.12 ; n.685-692, 2001.

NAKANO, K et al. Butyrate activates the waf1/cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. **J. Biol. Chem.** v.272 ; n.22199-22206, 1997.

NI et al. Anesthetic Isoflurane Induces DNA Damage Through Oxidative Stress and p53 Pathway. **Mol Neurobiol.** 2017.

NORIZZAH A.R., NUR AZIMAH K., ZALIHA O. Influence of enzymatic and chemical interesterification on crystallisation properties of refined, bleached and deodourised (RBD) palm oil and RBD palm kernel oil blends. **Food Res Int.** v.106 ; n.982-991, 2018.

O'BRATE, A. GIANNAKAKOU, P. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code?. **Drug Resist. Updates**, v.6, n.313-322. 2003.

OHRI N. et al. Radiotherapy for hepatocellular carcinoma: new indications and directions for future study. **J. Natl. Cancer Inst.** v.108, n.1–10. 2016.

ONG, T. et al. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis with dietary isoprenic derivatives: cellular and molecular aspects. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 12, n. 9, p. 1173 - 1190, 2012.

ONG T. et al. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. **Carcinogenesis.** v.27 ; n.1194-203, 2006.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation*, **Oxford**, v. 10, n.4, P431-P442, 2003.

ORTEGA J., 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.24339-47. 2016.

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

PALANI C., et al. Histone deacetylase inhibitors enhance the anticancer activity of nutlin-3 and induce p53 hyperacetylation and downregulation of MDM2 and MDM4 gene expression. **Invest New Drugs**. 2012.

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

PARRALES, A.; IWAKUMA, T. Targeting oncogenic mutant P53 for cancer therapy., **Front. Oncol.**, v.5, 2015.

PISOSCHI A. et al. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. **Eur J Med Chem**. v.209 ; n.112891. 2021.

PITOT, H. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**, v. 350, n. 9285, p. 859 – 60. 2001.

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

RACT J., GIOIELLI L., Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. **Food Research international**. v.36 ; n.149 – 159, 2003.

REED, S., QUELLE, D. p53 acetylation: regulation and consequences. **Cancers**, v.7, n.30–69. 2014.

RIZZI M. et al. Beta-carotene inhibits persistent and stimulates remodeling gamma GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. **Int J Vitam Nutr Res**. v.67 ; n.415-422. 1997.

ROBINSON K. et al. Regulation of the Intestinal Barrier Function by Host Defense Peptides. **Front Vet Sci**. v.2 ; n.57, 2015.

ROMUALDO G. et al. The combination of coffee compounds attenuates early fibrosis-associated hepatocarcinogenesis in mice: involvement of miRNA profile modulation. **J Nutr Biochem**. v.85 ; n.108479, 2020.

ROUSSEAU D., MARANGONI A. Tailoring the textural attributes of butter fat/canola oil blends via *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification 1. Compositional modifications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.46 ; n.2368-2374, 1998.

SAFARI S. et al . Hepatotoxicity of halogenated inhalational anesthetics. **Iran Red Crescent Med J**. v.16; n.9. 2014.

SAITO H. et al. Loss of butyrate-induced apoptosis in human hepatoma cell lines HCC-M and HCC-T having substantial Bcl-2 expression. **Hepatology**. v.27 ; n.1233-40, 1998.

SAMSON S. et al. Maintenance of Acromegaly Control in Patients Switching From Injectable Somatostatin Receptor Ligands to Oral Octreotide. **J Clin Endocrinol Metab**. v.105 ; n.3785–3797. 2020.

SANTOS-ROSA H., CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **European Journal of Cancer**. v.41, n.2381-402. 2005.

SCHWINGSHACKL L, HOFFMAN G. Adherence to Mediterranean diet and risk of cancer: an updated systematic review and meta-analysis of observational studies. **Cancer Med**. 2015.

SCHÜTZ C., et al. H2A.X Phosphorylation in Oxidative Stress and Risk Assessment in Plasma Medicine. **Oxid Med Cell Longev**. 2021.

SCOLASTICI C. et al. β -ionone inhibits persistent preneoplastic lesions during the early promotion phase of rat hepatocarcinogenesis: TGF- α , NF- κ B, and p53 as cellular targets. **Nutr Cancer**. v.66 ; n.234-41, 2014.

SCOLASTICI C. Tomato oleoresin inhibits DNA damage but not diethylnitrosamine- induced rat hepatocarcinogenesis, **Exp. Toxicol. Pathol**. v.60 ; n.59 – 68, 2008.

SEMPLE - ROBERTS et al. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. **Int. J. Cancer**, v.40, n.643 - 645, 1987.

STEWART B., WILD C. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. World cancer report 2014. Lyon; Geneva: **International Agency for Research on Cancer**, 2014.

SETIAWAN V. et al. Association of coffee intake with reduced incidence of liver cancer and death from chronic liver disease in the US multiethnic cohort. **Gastroenterology**; v.148 ; n.15, 2015.

SIES H, STAHL W, SEVANIAN A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **J Nutr**. v.5 ; n.969-72, 2005.

SILVA S. et al. Differential scanning calorimetry study on caprylins. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.120 ; n.711-717, 2015.

SMITH J. et al. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. **Adv Cancer Res**. v.108 ; n.73-112. 2012.

SMITH M., et al. Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. **Environ Health Perspect**. 2015.

SOLT, D.; FARBER, E. New principles for the analysis of chemical carcinogenesis. **Nature**, v. 263, n. 701 - 703, 1976.

SPORN M. B. et al. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids), **Fed Proc**, v.6, 1976.

SRINIVAS U. et al. ROS and the DNA damage response in cancer. **Redox Biol**. v.25 ; n.101084. 2019.

STELIOU K. et al. Butyrate Histone Deacetylase Inhibitors. **Bio Research**, v. 4, n.192 – 198, 2012.

STEWARD, W. P; BROWN, K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. **British Journal of Cancer**. v.109 ; n.1-7, 2013.

STURGEON C.; FASANO A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. **Tissue Barriers**.v.4 ; n.1251384, 2016.

SUROVA O.; ZHIVOTOVSKY B. Various modes of cell death induced by DNA damage **Oncogene**. 32 ; 3789-3797, 2013.

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.

TAKAI N, et al. Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. **Clin Cancer Res**. v.10; n.1141-9. 2004.

TOLEDO, L. et al. Inhibitory effects of lutein and lycopene on placental glutathione S – transferase – positive preneoplastic lesions and DNA strand breakage induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model of hepatocarcinogenesis. **Nutr. Cancer**, v. 47, n.62 – 69, 2003.

TORRE L. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin.** v.2 ; n.87-108, 2015.

TROSKO, J. The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biomed Pharmacother.** p. 326 – 331, 2005.

TUVIA S. et al. A novel suspension formulation enhances intestinal absorption of macromolecules via transient and reversible transport mechanisms. **Pharm Res.** v.31 ; p.2010–2021, 2014.

UMEMURA T. et al. Prevention of dual promoting effects of pentachlorophenol, an environmental pollutant, on diethylnitrosamine induced hepato and cholangiocarcinogenesis in mice by green tea infusion, **Carcinogenesis**, v.24 ; n.1105 – 1109, 2003 .

VELAZQUEZ, O.; LEDERER, H.; ROMBEAU, J. Butyrate and the colonocyte: Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.427, n.123-134. 1997.

VIEIRA A. et al. Efficacy of geraniol but not of β -ionone or their combination for the chemoprevention of rat colon carcinogenesis. **Braz J Med Biol Res.** v.44 ; n.538-45, 2011.

VINOLO, M., et al. Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat-fed mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** n.272-282, 2012.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.; Surfing the p53 network. **Nature**, n307-P310. 2000.

VOUSDEN, K. Activation of the p53 tumor suppressor protein. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1602, n.1, p. 47 – 59, 2002.

WALY RAPHAEL, S.; YANGDE, Z.; YUXIANG, C. Hepatocellular carcinoma: focus on different aspects of management. **ISRN Oncol.** v.2012. 2012.

WANG Y. et al. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit non- alcoholic steatohepatitis- promoted hepatocarcinogenesis in rats, **Int. J. Cancer** , v.126 ; n.1788 – 1796, 2010.

WILLETT W. Diet, nutrition, and avoidable cancer. **Environ Health Perspect** ; v.103, n.8, p.165–170, 1995.

WILLIS W.; MARANGONI A. Enzymatic interesterification. **In: Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. v.3, 2008.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine A Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, v.53 ; n.65-68, 2006.

XAVIER F. Mediterranean diet, culture and heritage: challenges for a new conception. **Public Health Nutr.**; v.12: n.1618–20, 2009.

XU J, et al. Green tea-derived theabrownin induces cellular senescence and apoptosis of hepatocellular carcinoma through p53 signaling activation and bypassed JNK signaling suppression. **Cancer Cell Int**. v.25; n.22:39. 2022.

YAMAGUCHI H., et al. P53 Acetylation Is Crucial for Its Transcription-Independent Proapoptotic Functions. **J. Bio Chem**, v. 284, p.11171-83, 2009.

YANG W. et al. Association of Intake of Whole Grains and Dietary Fiber with Risk of Hepatocellular Carcinoma in US Adults. **JAMA Oncol**. v.5 ; 879–886, 2019.

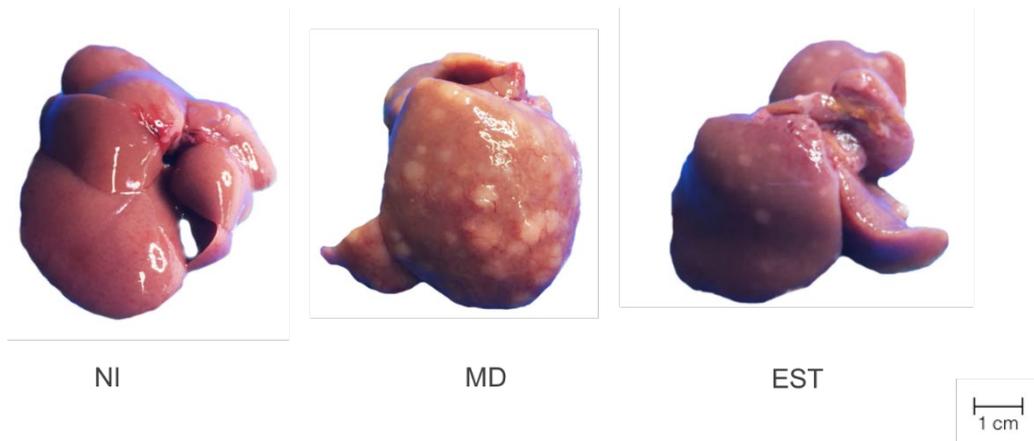
YOUNIS I. et al. Drug-Drug Interaction Studies of Methadone and Antiviral Drugs: Lessons Learned. **J. Clin. Pharmacol**. n.1-9, 2019.

ZIHNI C. et al. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.17 ; n.564-580, 2016.

ZHANG Z. et al. Evaluation of enzymatic interesterification in structured triacylglycerols preparation: a concise review and prospect. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v.22 ; n.1-15, 2020.

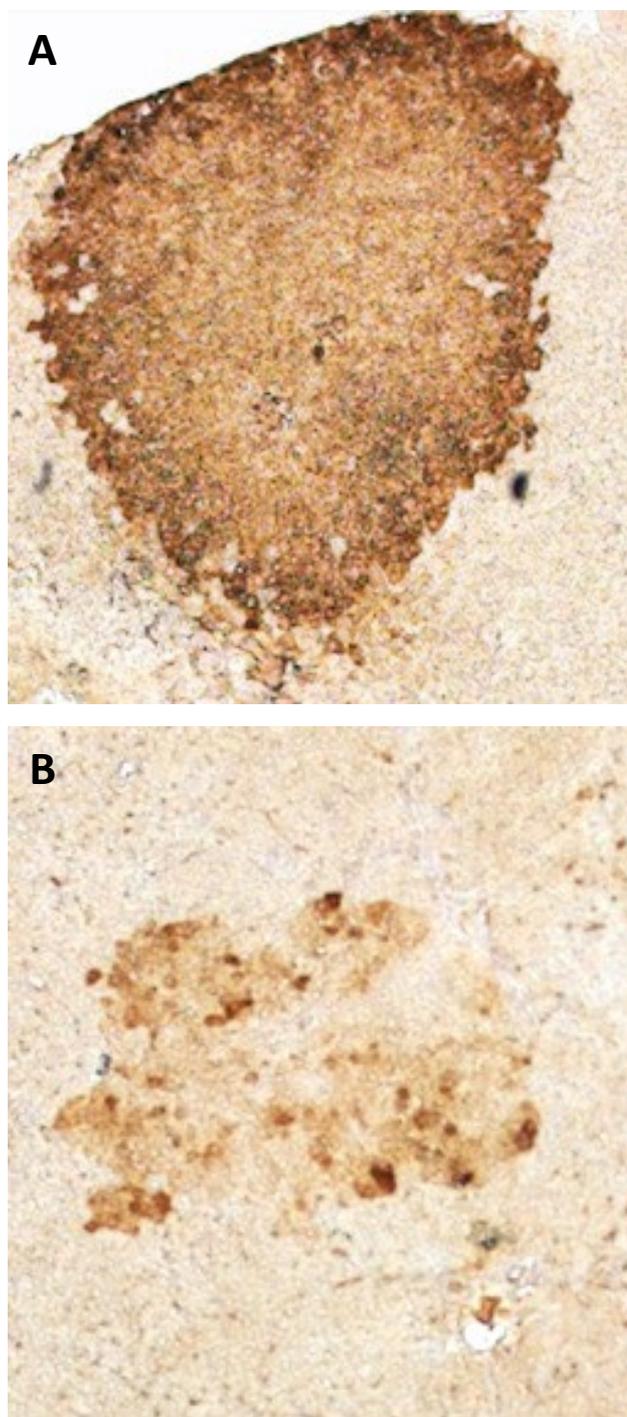
8. Anexos

ANEXO I



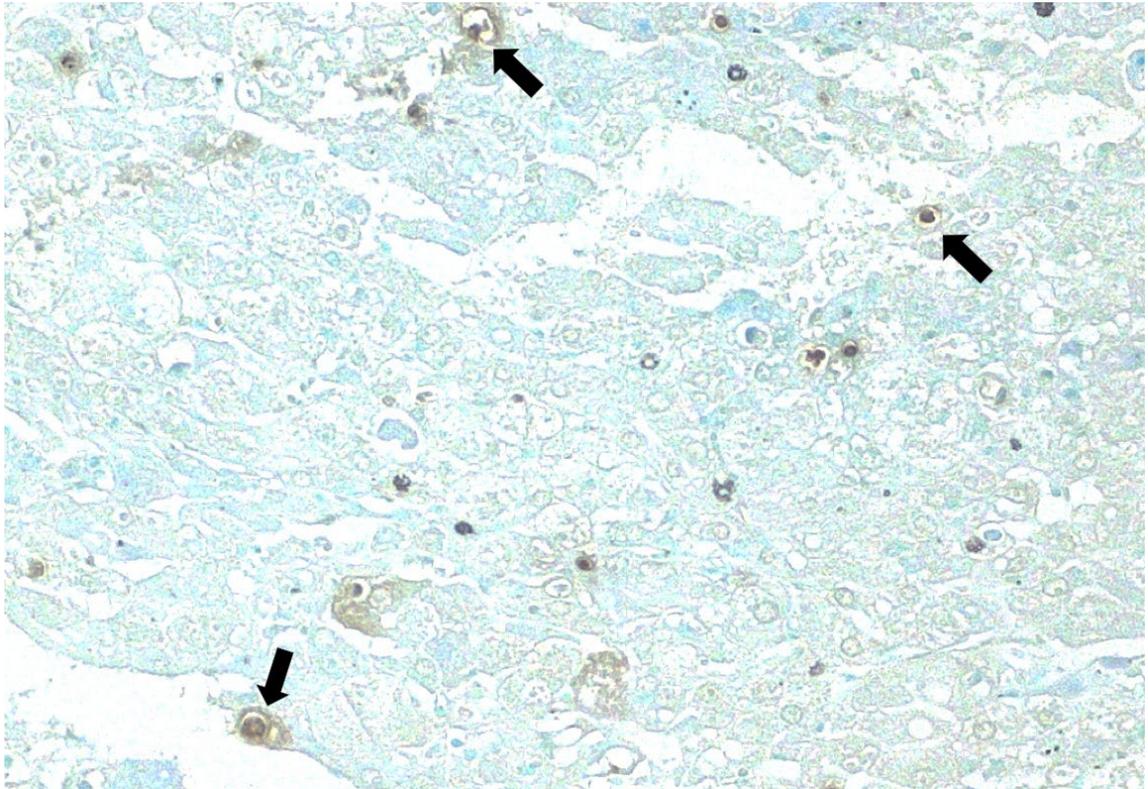
Anexo I: Imagem representativa da macroscopia dos fígados dos animais do grupo não iniciado (NI) e dos grupos submetidos ao modelo do hepatócito resistente (RH) tratados com maltodextrina (MD) e lipídios estruturados (EST), na fase de promoção da hepatocarcinogênese.

ANEXO II



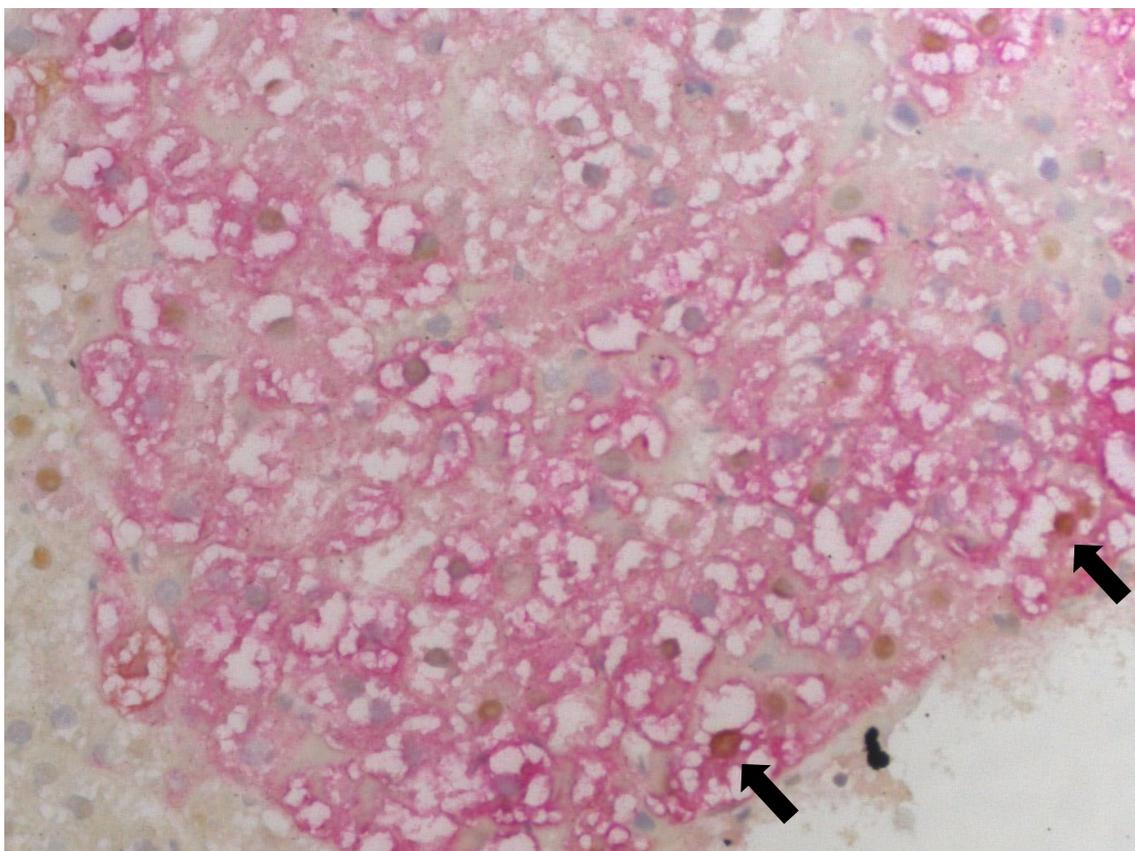
Anexo II: Imagens representativas de LPN persistente **(A)** e LPN em remodelação **(B)** (Objetiva 10x).

ANEXO III



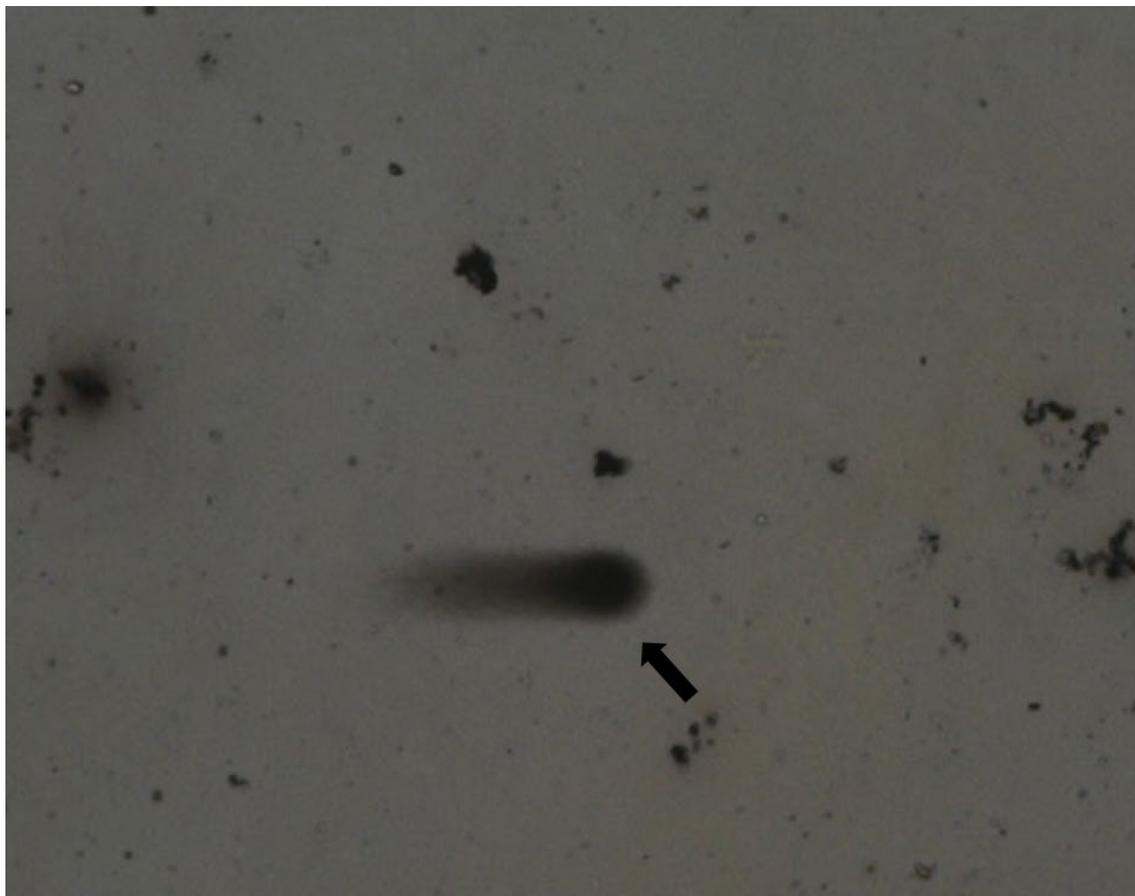
Anexo III: Imagem representativa de corpúsculos apoptóticos (Objetiva 40x).

ANEXO IV



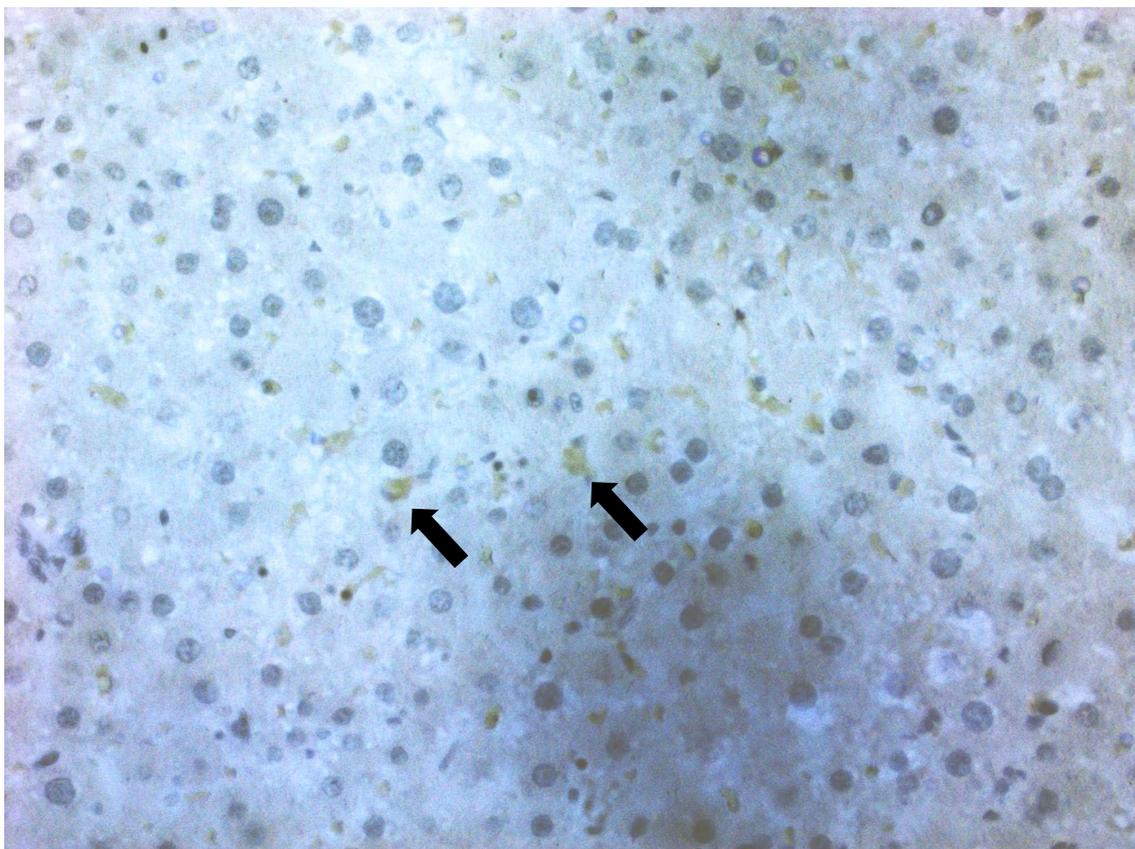
Anexo IV: Imagem representativa de células marcadas com PCNA na dupla marcação com GSTP+ (Objetiva 40x).

ANEXO V



Anexo V: Imagem representativa do cometa neutro (Objetiva 40x).

ANEXO VI



Anexo VI: Imagem representativa da marcação citoplasmática da proteína p53 (Objetiva 40x).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

CEUA/FCF 021.2018-P565

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Eventual atividade quimiopreventiva de lipídios estruturados obtidos a partir da tributirina e tricaprilina na fase de promoção da hepatocarcinogênese**, registrada com o nº 565, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Thais Pereira D'Amico**, 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	01/05/2018 a 31/05/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Fischer - 344
Número de animais	34
Peso/Idade	80-90g; 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, 03 de maio de 2018.


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