

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

ÁREA DE NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL

BETA-CAROTENO E VITAMINA A MODULAM A  
PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS OVAIS E A  
EXPRESSÃO GÊNICA PARA CONEXINA 43 EM MODELO  
*IN VIVO* DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR HEPÁTICA

MARIA MARGARETH VELOSO NAVES

Tese para obtenção do grau de

**Doutor**

Orientador:

Prof. Dr. FERNANDO SALVADOR MORENO

São Paulo

1999

MARIA MARGARETH VELOSO NAVES

**BETA-CAROTENO E VITAMINA A MODULAM A  
PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS OVAIS E A EXPRESSÃO  
GÊNICA PARA CONEXINA 43 EM MODELO *IN VIVO* DE  
DIFERENCIAÇÃO CELULAR HEPÁTICA**

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE  
**DOCTOR**

**COMISSÃO JULGADORA**

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno  
Orientador e Presidente

1º Examinador

Prof. Dr. José Luiz Guerra

2º Examinador

Prof. Dr. Sérgio Zuccolotto

3º Examinador

Prof. Dr. Hélio Vannucchi

4º Examinador

Profa. Dra. Sílvia Berlanga

São Paulo, 05 de abril de 1999

À minha mãe,  
Maria Aparecida Naves,  
pela existência tão serena,  
humilde e acolhedora.

Ao meu pai,  
Nabor Veloso Naves,  
(*in memoriam*)  
pelos exemplos de luta,  
otimismo e vida simples.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno

Aos professores Dr. Hélio Vannucchi (FM/USP-RP), Dr. João Roberto O. do Nascimento e Dra. Rosário Domingos C. Hirata (FCF/USP), Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli e Dr. José Luiz Guerra (FMVZ/USP)

Ao patologista Wagner Alexey B. Fiorio

Às amigas Elaine Regina Silveira e Nusa de Almeida Silveira

Aos colegas Alceu Jordão Jr., Ton Sen Wu, Luciana Toledo e Kênya de Sousa Ramos

Aos demais colegas do curso de pós-graduação em Ciência dos Alimentos

Aos funcionários do biotério e do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP, em especial à Sandra Mesquita do Nascimento

Aos funcionários da biblioteca do conjunto das químicas da USP, em especial ao Ângelo Antônio A. C. da Cruz

À CAPES (PICDT), FAPESP e CNPq

Aos meus familiares

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero

Muito Obrigada

## SUMÁRIO

RESUMO.....	07
LISTA DE ABREVIATURAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Aspectos gerais.....	12
1.2. Beta-caroteno e quimioprevenção do câncer.....	13
1.2.1. Associações epidemiológicas.....	14
<b>1.2.2. Ações em modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.....</b>	<b>15</b>
1.2.3. Ações em humanos.....	17
1.2.4. Possíveis mecanismos de ação contra o câncer.....	19
1.3. GJIC, conexinas, carcinogênese e beta-caroteno.....	21
1.3.1. Estrutura e função das GJIC.....	22
1.3.2. GJIC e carcinogênese.....	25
1.3.3. GJIC e Beta-caroteno.....	28
1.4. Diferenciação celular, células ovais e hepatocarcinogênese.....	29
1.4.1. Células ovais e hepatocarcinogênese.....	31
1.4.2. Modelo AAF/PH de diferenciação celular hepática.....	34
1.5. Beta-caroteno, conexinas e células ovais.....	36
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. Objetivo geral.....	39
2.2. Objetivos específicos.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1. Animais.....	40
3.2. Protocolo experimental.....	40
<b>3.3. Determinação das concentrações de beta-caroteno e vitamina A.....</b>	<b>42</b>
3.4. Análise histológica.....	43
3.4.1. Preparo do material.....	43
3.4.2. Avaliação morfológica.....	43
3.5. Análise imuno-histoquímica.....	44
3.5.1. Preparo do material.....	44
<b>3.5.2. Marcação com GST-P.....</b>	<b>45</b>
3.5.3. Avaliação morfométrica.....	45
<b>3.6. Análise da expressão gênica por <i>northern blot</i>.....</b>	<b>45</b>

3.6.1.Obtenção e preparo do RNA total.....	46
3.6.1.1.Extração do RNA total.....	46
3.6.1.2.Separação do RNA total por eletroforese.....	47
3.6.1.3.Transferência e fixação do RNA total.....	47
3.6.2.Hibridização.....	48
3.6.2.1.Obtenção e marcação das sondas de cDNA.....	48
3.6.2.2.Pré-hibridização.....	49
3.6.2.3.Hibridização.....	49
3.6.2.4.Revelação por auto-radiografia.....	49
3.7. Metodologia estatístico-experimental.....	50
3.8. Padronização da forma de apresentação desta tese.....	51
4. RESULTADOS.....	52
4.1. Evolução de peso e consumo de ração.....	52
4.2. Concentrações hepáticas de beta-caroteno e vitamina A.....	53
4.3. Cinética da proliferação de células ovais.....	58
4.3.1.Avaliação histológica (HE).....	58
4.3.2.Avaliação imuno-histoquímica (GST-P).....	59
<b>4.4. Expressões dos genes que codificam para as conexinas43 e 32.....</b>	<b>61</b>
5. DISCUSSÃO.....	65
5.1. Modelo AAF/PH adaptado para ratos Wistar.....	65
5.2. Níveis hepáticos de beta-caroteno e vitamina A.....	66
5.3. Proliferação de células ovais.....	68
5.4. Expressão gênica para conexinas no fígado.....	71
5.5. Beta-caroteno, diferenciação celular e carcinogênese.....	75
6. CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXO - ILUSTRAÇÕES.....	103
SUMMARY.....	111

## RESUMO

### BETA-CAROTENO E VITAMINA A MODULAM A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS OVAIS E A EXPRESSÃO GÊNICA PARA CONEXINA 43 EM MODELO *IN VIVO* DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR HEPÁTICA

Avaliaram-se os efeitos do  $\beta$ -caroteno e da vitamina A sobre o processo de proliferação de células ovas em modelo de diferenciação celular hepática. Para tanto, ratos machos Wistar foram tratados com  $\beta$ -caroteno (grupo BC – 70 mg/kg de peso corpóreo [pc]), vitamina A (grupo VA – 10 mg/kg pc) ou óleo de milho (CO – grupo controle) por via intragástrica e em dias alternados, durante 4 semanas consecutivas. Após este período, os animais foram submetidos ao modelo AAF/PH (6 x 20 mg AAF [2-acetilaminofluoreno] / kg pc e hepatectomia parcial) e sacrificados em diferentes dias após a cirurgia (HP). Foram colhidas amostras de fígado para determinação das concentrações de  $\beta$ -caroteno, retinol e palmitato de retinila (por CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência); para análises histológica (hematoxilina e eosina) e imuno-histoquímica (com anticorpos anti-GST-P), bem como para avaliação das expressões gênicas (por *northern blot*) para as conexinas (cx) 43 e 32. Observou-se, através das análises histológica e imuno-histoquímica, que o pico de proliferação das células ovas foi deslocado para dias mais tardios após HP, de forma análoga nos grupos BC e VA, quando comparados ao grupo controle. Além disso, foi constatado que o pico de expressão gênica para cx 43 foi também deslocado para dias mais tardios pós-HP, de forma similar nos grupos BC e VA, e que houve um aumento na expressão gênica para cx 43 entre o 10º e 16º dias após HP no grupo VA, em relação ao controle. Não foi observada diferença na expressão gênica para cx 32 entre os grupos. Conclui-se que o  $\beta$ -caroteno modulou a proliferação de células ovas e a expressão gênica para cx 43, retardando ambos os fenômenos, e que esta ação foi mediada em parte via retinóides ativos. Ainda, o carotenóide mostrou uma tendência em induzir, de forma intrínseca, a diferenciação das células ovas em hepatócitos.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AAF – 2-acetilaminofluoreno  
AAF/PH – 2-acetilaminofluoreno / hepatectomia parcial  
BC – grupo  $\beta$ -caroteno  
cDNA – DNA complementar  
Ck – citoqueratina (proteína do esqueleto celular)  
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência  
CO – grupo controle  
Cx – conexina  
DEN – dietilnitrosamina  
DEPC – dietil pirocarbonato  
F-344 – Fisher-344 (linhagem de ratos isogênicos)  
GJIC – comunicações intercelulares juncionais tipo hiato  
GST-P – glutathione S-transferase placentária  
HE – hematoxilina e eosina  
HP – hepatectomia parcial  
mRNA – RNA mensageiro  
RAR – receptor do ácido retinóico  
RH – hepatócito resistente  
RXR – receptor do retinóide  $\alpha$   
VA – grupo vitamina A



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática do protocolo experimental.....	42
FIGURA 2	Evolução do peso de ratos Wistar tratados com óleo de milho (CO – controle), $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), e submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular hepática. AAF: 2-acetilaminofluoreno. HP: hepatectomia parcial.....	53
FIGURA 3	Consumo de ração de ratos Wistar tratados com óleo de milho (CO), $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), e submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular hepática. AAF: 2-acetilaminofluoreno.....	53
FIGURA 4	Concentração de $\beta$ -caroteno em fígado de ratos Wistar (média $\pm$ D.P. para quatro animais) tratados com óleo de milho (CO), $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial.....	56
FIGURA 5	Concentração de retinol em fígado de ratos Wistar (média $\pm$ D.P. para quatro animais) tratados com óleo de milho (CO), $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial.....	56
FIGURA 6	Concentração de palmitato de retinila em fígado de ratos Wistar (média $\pm$ D.P. para quatro animais) tratados com óleo de milho (CO), $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial .....	57
FIGURA 7	Representação esquemática dos resultados da análise histoquímica (HE) em fígado de ratos tratados com óleo de milho (CO), $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial. Os dados são representativos de Quatro animais .....	58
FIGURA 8	Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos tratados com $\beta$ -caroteno (11d), óleo de milho (16d) e vitamina A (16d'), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial : <b>11d</b> = 11º dia pós-hepatectomia – à esquerda, visão panorâmica de regiões periportais contendo alta celularidade (estruturas coradas em tons de lilás mais escuro) invadindo a zona 2 do ácino hepático, e presença de ductos neoformados (seta) (HE,165X), – à direita, detalhe das células ovais (seta) na região periportal (HE,560X); <b>16d</b> = 16º dia pós-hepatectomia – visão panorâmica do parênquima hepático com discreta celularidade nas regiões periportais (tons de lilás mais escuro) demarcando os ácinos hepáticos (HE,66X); <b>16d'</b> = 16º dia pós-hepatectomia – visão panorâmica do parênquima hepático, evidenciando a presença de ductos neoformados na zona 2 do ácino hepático (seta fina) e de foco de hepatócitos (seta grossa) (HE,66X).....	103

- FIGURA 9 Volume (%) de área ocupada por células ovais (GST-P +), em regiões periportais de fígado de ratos Wistar (média para três ou quatro animais) tratados com óleo de milho (CO),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial ..... 60
- FIGURA 10 Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos tratados com óleo de milho (grupo controle), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial: **0d** = tempo zero (à hepatectomia) – à esquerda, visão panorâmica do parênquima hepático evidenciando baixa celularidade nas regiões periportais (seta) (GST-P + hematoxilina, 66X), – à direita, espaço-porta em detalhe, evidenciando células epiteliais biliares (estruturas coradas em tons de castanho mais escuro) e presença ocasional de células ovais (seta) (GST-P + hematoxilina, 560X; **7d** = 7º dia pós-hepatectomia – à esquerda, visão panorâmica do parênquima hepático evidenciando regiões periportais (seta) com celularidade aumentada (GST-P + hematoxilina, 66X), – à direita, visão panorâmica de espaços portais e adjacências (GST-P + hematoxilina, 165X)..... 105
- FIGURA 11 Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos tratados com óleo de milho (grupo controle), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial: **9d** = 9º dia pós-hepatectomia – à esquerda, visão panorâmica do parênquima hepático revelando intensa proliferação de células ovais a partir dos espaços portais, invadindo o parênquima ("manchas" em tons de castanho mais escuro) (GST-P + hematoxilina, 66X), – à direita, detalhe da intensa celularidade (pico de proliferação das células ovais) na região periportal (GST-P + hematoxilina, 165X); **11d** = 11º dia pós-hepatectomia – à esquerda, visão panorâmica do parênquima hepático evidenciando redução na celularidade periportal em relação ao 9d (GST-P + hematoxilina, 66X), – à direita, detalhe de espaços portais e adjacências com celularidade reduzida e presença de hepatócitos marcados (seta) (GST-P + hematoxilina, 165X)..... 107
- FIGURA 12 Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos tratados com óleo de milho (13d e 16d) e  $\beta$ -caroteno (13d'), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial: **13d** e **16d** = 13º e 16º dias pós-hepatectomia – visão panorâmica de parênquimas hepáticos com discreta celularidade nas zonas periportais, evidenciando foco de hepatócitos (13d, seta) e a arquitetura acinosa do fígado em 16d (GST-P + hematoxilina, 66X); **13d'** = 13º dia pós-hepatectomia – à esquerda, visão panorâmica do parênquima hepático com intensa celularidade nas regiões periportais (coradas em tons de castanho) delimitando os ácinos hepáticos (GST-P + hematoxilina, 66X), – à direita, detalhe da proliferação de células ovais (coradas em tons de castanho mais escuro), a partir da região periportal, invadindo o parênquima (GST-P + hematoxilina, 165X)..... 109

- FIGURA 13 Expressões dos genes que codificam para as conexinas 43 (Cx 43) e 32 (Cx 32) em fígado de ratos Wistar tratados com óleo de milho – grupo controle (CO),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais e sacrificados em diferentes dias pós-hepatectomia. Cada auto-radiografia ilustra os resultados de três experimentos.  $\beta$ -Actina foi usada como um controle..... 62
- FIGURA 14 Expressão do gene que codifica para a cx 43 (relativa ao tempo zero) em fígado de ratos Wistar tratados com óleo de milho (CO),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial ..... 63

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ASPECTOS GERAIS

As evidências epidemiológicas que fundamentam um papel do  $\beta$ -caroteno na quimioprevenção do câncer têm sido confirmadas, sobretudo em estudos experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Neste último caso, constatou-se uma atividade inibitória do carotenóide sobre lesões pré-neoplásicas, através de modelos de hepatocarcinogênese como o do hepatócito resistente (modelo RH), entre outros (Naves & Moreno, 1998).

Nos modelos *in vitro*, como no sistema de células C3H10T1/2, de fibroblastos de camundongos, por sua vez, o  $\beta$ -caroteno tem se revelado um agente anticarcinogênico capaz de inibir a transformação neoplásica. Este efeito é em parte mediado via indução da formação de comunicações intercelulares juncionais tipo hiato (*gap junctions intercellular communication - GJIC*), que funcionam como uma rede de comunicação direta entre células, veiculando fatores que controlam a diferenciação e proliferação celulares, capazes de inibir ou mesmo suprimir o processo de carcinogênese (Yamasaki *et al.*, 1995, Goodenough *et al.*, 1996). Sugere-se que esta ação sobre as junções tipo hiato resulta de uma possível atividade do carotenóide em nível genômico, através da modulação da expressão do gene que codifica para a conexina 43, uma proteína estrutural das GJIC nas células C3H10T1/2 (Bertram & Bortkiewicz, 1995).

Por outro lado, postula-se que no fígado do animal adulto, as denominadas células ovais (pequenas células com núcleo ovóide), que proliferam durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese, são células-mãe que podem dar origem a hepatócitos, bem como ao câncer hepático (Thorgeirsson, 1996). Tem-se observado uma atividade inibitória do  $\beta$ -caroteno sobre a população de células ovais no modelo RH, achado indicativo de uma ação do carotenóide na diferenciação celular hepática, o que poderia explicar seu papel protetor contra lesões pré-neoplásicas no fígado (Moreno *et al.*, 1995a, Rizzi *et al.*, 1997, Dagli *et al.*, 1998).

Assim, no presente estudo objetivou-se investigar os efeitos da administração de  $\beta$ -caroteno a ratos submetidos a modelo de diferenciação celular hepática, sobre o processo de proliferação de células ovais, no sentido

de contribuir para um maior entendimento do papel do carotenóide na diferenciação celular e, por conseguinte, na quimioprevenção do câncer.

## **1.2. BETA-CAROTENO E QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER**

Tem-se acumulado na literatura, por mais de vinte anos, evidências de que o  $\beta$ -caroteno pode desempenhar um papel relevante na quimioprevenção do câncer (Peto *et al.*,1981, Mathews-Roth,1985, Krinsky,1991, Gerster,1993, Gerster,1995, Ziegler *et al.*,1996a, Burri,1997, Naves,1998). Contudo, a investigação nesta área e a interpretação dos resultados têm sido dificultadas pelo fato de que o câncer é o desfecho de um processo de múltiplas etapas (em geral dispostas em três estágios definidos por iniciação, promoção e progressão), que envolve um período de vários anos ou mesmo décadas (Pitot & Dragan,1996), gerando grandes limitações nos estudos epidemiológicos nutricionais (Langseth,1996, Doll,1996) e na definição de protocolos experimentais.

Os resultados promissores obtidos neste campo de investigação, por sua vez, têm despertado grande interesse nos mecanismos biológicos de ação do carotenóide como agente quimiopreventivo. Assim, tem-se evidenciado que o  $\beta$ -caroteno está envolvido em diferentes processos biológicos, de diversos modos. Para tanto, Olson (1989) sugere distinguir as propriedades biológicas dos carotenóides em três categorias - funções, associações e ações. Nesta seção o assunto será abordado segundo esta perspectiva.

A função pró-vitáminica A constitui, até o momento, a única função biológica comprovada do  $\beta$ -caroteno em humanos (Olson,1996). Cerca de 70 % do aporte de vitamina A da dieta humana é derivado dos carotenóides, presentes nas frutas e vegetais, especialmente do  $\beta$ -caroteno (FAO & WHO, 1988). A absorção, bioconversão a retinol e metabolismo em geral do carotenóide têm sido alvo de intensa investigação, gerando a publicação de diversas revisões sobre o assunto, embora muitos pontos ainda necessitam de esclarecimentos (Wang,1994, Parker,1996, van Vliet,1996, Furr & Clark, 1997, Silveira & Moreno,1998).

### 1.2.1. Associações Epidemiológicas

A associação entre  $\beta$ -caroteno e câncer tem sido bastante investigada através de estudos epidemiológicos observacionais, tipo caso-controle e coorte; de forma mais específica a partir do trabalho de revisão de Peto *et al.* (1981), e da evolução dos métodos de análises químicas e bioquímicas de diferentes tipos de carotenóides. Estes autores especularam que o  $\beta$ -caroteno seria o fator, relacionado à ingestão de vegetais verdes e de vitamina A, responsável pelo efeito protetor contra o câncer. Desde então, tem-se pesquisado esta hipótese em inúmeros estudos epidemiológicos (revisado por Naves, 1998).

No entanto, até o momento, a associação mais consistente que se pode evidenciar dos estudos observacionais é uma relação inversa entre consumo de frutas e vegetais (em especial os de cor verde-escuro e amarelo-alaranjado), ou nível sangüíneo de  $\beta$ -caroteno (soro ou plasma), e risco de alguns tipos de cânceres, tais como de pulmão e de estômago (Ziegler, 1991, Block *et al.*, 1992, van Poppel & Goldbohm, 1995, Doll, 1996). Assim, uma dieta rica em frutas e vegetais reduz o risco de câncer de pulmão em cerca de duas vezes (Ziegler *et al.*, 1996a).

Não se pode estabelecer uma relação exclusiva entre  $\beta$ -caroteno e câncer, através dos dados disponíveis de estudos epidemiológicos observacionais, uma vez que a maioria dos trabalhos não analisa o consumo do carotenóide separadamente. Dados de estudos antigos, reanalisados, sugerem que um baixo consumo de  $\beta$ -caroteno pode implicar em maior risco de câncer de pulmão, embora em menor proporção que o consumo reduzido de vegetais fontes de carotenóides (Le Marchand *et al.*, 1993, Ziegler *et al.*, 1996b).

Além disso, os estudos não exploraram convenientemente a influência relativa de variáveis da dieta tais como outros tipos de carotenóides, outros componentes das frutas e vegetais (vitaminas, fibras, outros fitoquímicos) ou, ainda, outros itens da dieta como colesterol, carne e álcool. Por outro lado, a concentração de  $\beta$ -caroteno no sangue pode refletir apenas o consumo de frutas e vegetais, e ser afetada por diversos fatores que não foram adequadamente controlados na maioria dos estudos, como por exemplo, o tabagismo (Ziegler *et al.*, 1992, Koo, 1997).

Pode-se, ainda, concluir destes relatos que o  $\beta$ -caroteno, se protetor, seria efetivo em quantidades fisiológicas, normalmente encontradas em uma dieta rica em frutas e vegetais, ou seja, cerca de 4 a 6 mg/dia (Shekelle *et al.*, 1981, Ziegler *et al.*, 1992, Ziegler *et al.*, 1996b). Além disso, os estudos prospectivos, tipo coorte, por serem de longa duração (em geral mais de uma década), sugerem que o carotenóide, se protetor, teria ação nos estágios iniciais da carcinogênese (Stähelin *et al.*, 1991, van Poppel & Goldbohm, 1995).

### 1.2.2. Ações em Modelos *in Vitro* e *in Vivo*

Estudos em modelos *in vitro* têm revelado uma ação inibitória do  $\beta$ -caroteno nas transformações neoplásicas (Krinsky, 1993). Assim, por exemplo, constatou-se, no sistema de células C3H/10T1/2, de fibroblastos de camundongos, inibição da produção de focos de células transformadas, com  $\beta$ -caroteno em concentrações de cerca de 10  $\mu$ M, aplicado após a iniciação (indução química ou física), ou com outros carotenóides sem atividade pró-vitamina A, tais como cantaxantina e licopeno (Pung *et al.*, 1988, Bertram *et al.*, 1991, Kennedy & Krinsky, 1994).

Além disso, observou-se ação citotóxica seletiva do  $\beta$ -caroteno, quando presente em altas concentrações no meio de cultura (70  $\mu$ M), resultando em inibição da proliferação de células de diferentes neoplasias humanas (Schwartz & Shklar, 1992). Mais recentemente constatou-se efeito semelhante (Iftikhar *et al.*, 1996), empregando o carotenóide em concentrações bem menores (cerca de 3 ou 6  $\mu$ M), em células de câncer de cólon. Em outro estudo (Levy *et al.*, 1995), entretanto, observou-se uma ação citotóxica seletiva do licopeno muito mais evidente que a do  $\beta$ -caroteno, na inibição da proliferação de células de cânceres humanos (endometrial, mamário e pulmonar). Assim, esta ação, se houver, parece independente da concentração e da atividade pró-vitamina A do carotenóide, sendo necessários mais estudos para esclarecer o papel do  $\beta$ -caroteno na proliferação de neoplasmas, sobretudo *in vivo*, bem como para elucidar os mecanismos envolvidos.

A ação quimiopreventiva do  $\beta$ -caroteno em modelos animais, foi primeiro constatada de forma controlada, por Epstein (1977), em carcinomas

de pele. Mathews-Roth e seu grupo (Mathews-Roth,1982, Mathews-Roth, 1985, Mathews-Roth & Krinsky,1987) confirmaram estes achados em vários estudos, através da indução (química e/ou física) de câncer de pele em camundongos suplementados com  $\beta$ -caroteno em altas concentrações na ração, bem como investigaram a ação de outros carotenóides sem atividade pró-vitáminica A. Da mesma forma, foi evidenciada ação inibitória do  $\beta$ -caroteno em cânceres da cavidade oral, induzidos na mucosa da bolsa facial de hamsters (Suda *et al.*,1986, Gijare *et al.*,1990), bem como em outros tipos de cânceres, especialmente os de origem epitelial (revisado por Gerster, 1993).

Estudos em diversos modelos animais têm revelado um potencial anticarcinogênico do  $\beta$ -caroteno, sobretudo nas etapas de iniciação ou de promoção precoce do processo neoplásico, inibindo a formação de lesões pré-neoplásicas. Além disso, apontam ainda que o carotenóide é capaz de proteger em estágios mais avançados do processo, retardando ou bloqueando a formação de lesões neoplásicas nos animais (revisado por Gerster,1995, Naves,1998). Porém, neste último caso, devido a limitações nos protocolos experimentais utilizados, não se pode definir com exatidão em que fase do processo o  $\beta$ -caroteno atuou (Naves & Moreno,1998).

O fígado tem sido também alvo de estudos do processo de carcinogênese, através de diferentes modelos, entre os quais, o do hepatócito resistente (RH), um modelo bem definido que permite melhor resolução e sincronização das diferentes etapas do processo (Solt & Farber,1976). Moreno e seu grupo introduziram o estudo da ação quimiopreventiva do  $\beta$ -caroteno no modelo RH modificado (Semple-Roberts *et al.*,1987), avaliando seu potencial modulador nas etapas de iniciação e de seleção/promoção. Desse modo, constataram ação inibitória do carotenóide no desenvolvimento de lesões hepáticas pré-neoplásicas, em ratos Wistar, nas fases de iniciação e de promoção precoce (Moreno *et al.*,1991, Moreno *et al.*,1995a, Rizzi *et al.*, 1997, Dagli *et al.*,1998, Fiorio, 1998). Estes achados têm sido confirmados em relatos de grupos de pesquisa distintos, através de estudos envolvendo inclusive outros carcinógenos e ratos de diferentes linhagens (Sarkar *et al.*, 1994, Sarkar *et al.*,1995, He *et al.*,1997, Gradelet *et al.*,1998).

Vale acrescentar que o uso de retinóides (naturais ou sintéticos) em vários modelos animais de carcinogênese, ao contrário do  $\beta$ -caroteno, sugere



uma ação inibitória na promoção ou progressão, mais que na iniciação, sobretudo na carcinogênese de pele e das glândulas mamárias, respectivamente. No caso da hepatocarcinogênese química experimental, os relatos disponíveis evidenciam resultados contraditórios (revisado por Moon *et al.*,1994, Lotan,1996). Entretanto, em estudo recente, a administração de vitamina A (acetato de retinila) por oito semanas consecutivas, reduziu a incidência de câncer hepático na fase de progressão, em ratos Wistar submetidos ao modelo RH (Silveira,1998).

### **1.2.3. Ações em Humanos**

A suplementação com  $\beta$ -caroteno tem se mostrado eficaz na reversão da leucoplaquia oral, considerada uma lesão pré-neoplásica do câncer da cavidade oral (Garewal & Shamdas,1991), o qual constitui um dos seis mais freqüentes tipos de cânceres no mundo, e cuja causa principal é o tabaco (Parkin *et al.*,1993).

Esta ação foi primeiramente constatada em estudo conduzido na Índia com mascadores de fumo ou de noz de areca (Stich *et al.*,1988). Posteriormente, várias pesquisas mostraram uma reversão ou supressão de 50 a 60 % dos casos de leucoplaquia, em suas formas iniciais, em indivíduos tratados com cerca de 30 a 60 mg/dia de  $\beta$ -caroteno, por aproximadamente seis meses (revisado por Garewal,1995). Resultados bem promissores foram alcançados em estudo mais recente (Barth *et al.*,1997), com redução significativa do número e grau de displasia da mucosa oral, em 97,5 % dos casos tratados com  $\beta$ -caroteno, associado às vitaminas E e C, durante 12 semanas. Além disso, os efeitos quimiopreventivos destes antioxidantes foram mais evidentes quando o consumo de álcool e tabaco foi interrompido. Contudo, não se conhece a importância relativa destes achados na incidência de câncer da cavidade oral.

No caso de estudos clínico-epidemiológicos, no início da década de oitenta, instituições e pesquisadores foram motivados a conduzir estudos de suplementação farmacológica crônica com o carotenóide, coordenados pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos EUA, para esclarecer a relação causal entre  $\beta$ -caroteno e câncer, hipotetizada a partir dos achados epidemiológicos (Peto *et al.*,1981), e constatada em estudos experimentais então disponíveis (Mathews-Roth,1985).

No momento atual já foram concluídos quatro estudos epidemiológicos de intervenção (de grande porte), utilizando o  $\beta$ -caroteno na prevenção primária do câncer. Os estudos foram realizados em milhares de indivíduos, a partir de quarenta anos de idade, suplementados com doses farmacológicas crônicas do carotenóide (15 a 30 mg/dia), isolado ou associado a outros micronutrientes (revisado por Burri,1997, Naves,1998). No estudo de Linxian (Blot *et al.*,1993), o  $\beta$ -caroteno foi benéfico para indivíduos de populações com baixo consumo de micronutrientes e com concentrações plasmáticas reduzidas do carotenóide ( $0,11\mu\text{mol/L}$ ), associado à vitamina E e selênio. Entretanto, seu efeito foi nulo para indivíduos aparentemente saudáveis e bem nutridos, no estudo PHS (*Physicians' Health Study*) (Hennekens *et al.*, 1996). Além disso, o carotenóide foi prejudicial a grupos de populações de alto risco para câncer de pulmão, aumentando em 18 e 28 % a incidência de câncer de pulmão, nos estudos ATBC (*Alpha-tocopherol, Beta-carotene Cancer Prevention Study*) (Alpha-tocopherol...,1994) e CARET (*Beta-Carotene Retinol Efficacy Trial*) (Omenn *et al.*,1996), respectivamente. Nestes estudos constataram-se níveis basais de  $\beta$ -caroteno no soro de  $0,3\mu\text{mol/L}$ , compatíveis com os encontrados em diferentes populações, ou seja,  $0,2$  a  $0,6\mu\text{mol/L}$  (Burri, 1997). Ao final das intervenções, comprovou-se que houve uma suplementação efetiva do carotenóide, resultando em níveis dez vezes acima do basal.

Diversas hipóteses têm sido aventadas para explicar o efeito negativo do  $\beta$ -caroteno, constatado nesses estudos. Uma delas baseia-se no fato de que estes indivíduos, com idade a partir de cinquenta anos, apresentavam história antiga de exposição ao tabaco ou ao asbesto, podendo já estar em curso um processo carcinogênico no início do estudo. Dessa forma, o carotenóide estaria sendo administrado tardiamente no processo (fase promocional avançada), uma vez que o  $\beta$ -caroteno parece proteger nos estágios iniciais da carcinogênese, como sugerido nos estudos coorte (revisado por van Poppel & Goldbohm,1995) e em modelos animais (revisado por Naves & Moreno,1998). Este fato, associado às doses elevadas do carotenóide (20 ou 30 mg/dia, que representavam no mínimo dez vezes o consumo habitual dos indivíduos pesquisados), têm orientado nas análises disponíveis sobre estes achados inesperados (Ziegler *et al.*,1996a, De Luca &

Ross,1996, Mayne,1996, Erdman Jr. *et al.*,1996, Rautalahti *et al.*,1997, Potter, 1997, Albanes *et al.*,1997).

Os mecanismos celulares e moleculares possivelmente envolvidos com o efeito deletério de doses farmacológicas crônicas de  $\beta$ -caroteno, para tabagistas inveterados, foram por nós explorados em trabalho de revisão publicado recentemente (Naves & Moreno,1998). A esse respeito discute-se que, uma provável ação pró-oxidante crônica do  $\beta$ -caroteno potencializou o estado oxidativo presente nos pulmões dos tabagistas em fase promocional avançada do processo de carcinogênese, sendo a referida ação gerada no ambiente celular a partir da interação entre vários fatores, incluindo a tensão de oxigênio, a concentração do carotenóide e a disponibilidade de outros antioxidantes (Naves & Moreno,1998, Palozza,1998).

#### **1.2.4. Possíveis Mecanismos de Ação contra o câncer**

Têm-se proposto vários mecanismos que podem estar, possivelmente, envolvidos com a ação quimiopreventiva do  $\beta$ -caroteno. Apesar do grande esforço que se tem dispensado na investigação dos mesmos, existem muitos relatos conflitantes, pouco se sabendo, conclusivamente, a respeito do assunto.

Além da função pró-vitâmica A do  $\beta$ -caroteno, alguns fatos levaram os pesquisadores a suspeitar de outros mecanismos de ação, intrínsecos à molécula intacta do carotenóide. Têm-se como exemplos disso, as seguintes constatações: o  $\beta$ -caroteno poderia se acumular em diversos tecidos do organismo (Shapiro *et al.*,1984); outros carotenóides sem atividade pró-vitâmica A conhecida em mamíferos, como a cantaxantina, apresentavam ação anticarcinogênica (Mathews-Roth,1982); a ingestão de vitamina A pré-formada, ao contrário dos carotenos, não foi associada ao risco de câncer de pulmão (Peto *et al.*,1981). Posteriormente, observou-se ação quimiopreventiva do carotenóide, *per se*, através de estudos *in vitro* (Stich & Dunn,1986, Pung *et al.*,1988, Zhang *et al.*,1992) e *in vivo* (Moreno *et al.*, 1995a, Rizzi *et al.*,1997, Dagli *et al.*,1998).

A bioconversão do  $\beta$ -caroteno a retinóides e sua ação antioxidante, constituem os mecanismos de proteção mais aventados na literatura. Estes e alguns outros propostos mais recentemente, estão revisados no trabalho por nós realizado, citado no item anterior (Naves & Moreno,1998).

A conversão metabólica do  $\beta$ -caroteno a retinóides ocorre através de clivagem central e/ou excêntrica da molécula, nas células do intestino e do fígado, e possivelmente em outros tecidos (Wang *et al.*,1991), gerando, em última análise, ácidos retinóicos (todo-*trans* e 9-*cis*) que podem atuar em nível genômico, modulando as expressões de genes que controlam a diferenciação e proliferação celulares. Esta ação se dá através da interação com receptores nucleares específicos, os assim chamados RARs e RXRs, com seus respectivos subtipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , os quais se ligam, como dímeros, a seqüências próprias de nucleotídios presentes nos elementos de resposta de seus genes-alvo (Mangelsdorf,1994, Silveira & Moreno,1998).

Vale esclarecer que o termo retinóides inclui a vitamina A (retinol) e seus metabólitos naturais (retinal e ácido retinóico), bem como seus derivados sintéticos (Sporn & Roberts,1985). Sabe-se que a vitamina A (retinol) exerce funções biológicas diversas incluindo a participação no desenvolvimento fetal, na visão, reprodução, bem como age sobre a diferenciação e proliferação celulares, sobretudo na forma de ácido retinóico (Ross & Ternus,1993). Além disso, os retinóides exibem atividade quimiopreventiva, tanto em modelos de carcinogênese experimental, como também em alguns tipos de cânceres em humanos (Lotan,1996).

Por outro lado, o  $\beta$ -caroteno como parte do sistema antioxidante do organismo pode, sob condições definidas, atuar como potente neutralizador de espécies reativas de oxigênio e seqüestrador de radicais livres, sobretudo a baixas pressões parciais de oxigênio, encontradas na maioria dos tecidos em condições fisiológicas (iguais ou menores que 150 torr ou 20 kPa), e em baixas concentrações (Burton & Ingold,1984). Desse modo, pode inibir a peroxidação lipídica no interior de membranas, reagindo preferencialmente com o oxigênio molecular *singlet* ( $^1O_2$ ) e com o radical peroxila ( $ROO^*$ ), bloqueando a propagação das reações de oxidação na cadeia lipídica, mantendo assim a integridade e fluidez de membranas (Burton,1989, Rousseau *et al.*,1992). Além disso, o carotenóide, como modulador do balanço oxidativo no organismo, pode inibir inúmeros processos oxidativos ligados à carcinogênese, em especial nas etapas de iniciação e promoção do processo, evitando inclusive dano oxidativo no DNA (revisado por Palozza & Krinsky,1992, Naves & Moreno,1998).

Até o momento existe pouca evidência sobre o papel do  $\beta$ -caroteno em nível genômico. Tem-se relatado ação do carotenóide na expressão do gene que codifica para a conexina 43, uma proteína estrutural das junções intercelulares tipo hiato (GJIC), em fibroblastos de camundongos e humanos (Zhang *et al.*,1992, Zhang *et al.*,1995). Essas comunicações célula-célula servem como um canal condutor de sinais regulatórios do crescimento, entre outros, capazes de inibir a proliferação tanto de células normais quanto neoplásicas (Loewenstein & Rose, 1992). Na carcinogênese, observa-se redução dessas junções (Krutovskikh *et al.*,1995). Além disso, Moreno *et al.* (1995b) constataram, em modelo *in vivo*, que o  $\beta$ -caroteno é capaz de inibir, através de mecanismos pós-transcricionais, a expressão do gene que codifica a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase (EC1.1.1.34), cuja atividade é considerada limitante na síntese endógena de colesterol. Sabe-se que a referida síntese (e a dos demais produtos derivados do mevalonato) está associada com a proliferação celular e a transformação neoplásica (Soma *et al.*,1992, Bennis *et al.*,1993).

Discute-se ainda que o  $\beta$ -caroteno poderia modular a atividade de enzimas envolvidas com a metabolização de xenobióticos (Basu *et al.*,1987, Edes *et al.*,1989, Edes *et al.*,1991, Manorama *et al.*,1993, Sarkar *et al.*,1994), a resposta imune (Bendich,1989, Bendich,1991, Krinsky,1991), e mais recentemente, a diferenciação celular (Nikawa *et al.*,1995, Gross *et al.*,1997, Biesalski & Schäffer,1997). Este último caso baseia-se em dados obtidos em modelos *in vitro*, embora se suspeite que pelo menos parte do efeito observado seja devido à conversão (enzimática ou química) a retinóides ativos. Sendo assim, são necessários mais estudos, especialmente *in vivo*, para definir o real papel do carotenóide, *per se*, na diferenciação celular.

### **1.3. GJIC, CONEXINAS, CARCINOGENESE E BETA-CAROTENO**

Conexões intercelulares juncionais tipo hiato (GJIC) constituem a única estrutura conhecida que permite a comunicação citossólica direta entre células. Através das GJIC são veiculados fatores de importância fundamental para a manutenção da homeostase dos tecidos e controle da diferenciação e proliferação celulares. São formadas por canais transmembranosos denominados conexons (hemicanal), que por sua vez são constituídos por

seis subunidades de proteínas (conexinas) ao redor de um poro central. Conexons de células opostas se conectam formando um canal completo (Beyer *et al.*, 1990).

Este tipo de comunicação celular parece ter um papel importante na carcinogênese (Yamasaki *et al.*, 1995). Sugere-se que as GJIC permitem manter a célula “iniciada” (com dano irreversível no material genético) em comunicação juncional com as células não transformadas do tecido adjacente. Assim, as GJIC funcionam como um canal condutor de sinais que regulam a proliferação, da célula normal para a célula “iniciada”, provavelmente suprimindo sua transformação neoplásica (Yamasaki, 1990, Bertram, 1994).

O  $\beta$ -caroteno, bem como outros carotenóides sem atividade pró-vitamínica A, induzem a formação de GJIC, avaliada através de microinjeção de corante fluorescente, em células C3H10T1/2 em cultura (Zhang *et al.*, 1991). Esta ação parece ser mediada pela modulação da expressão do gene que codifica para a proteína conexina 43, a mais abundante proteína das junções tipo hiato em várias células de mamíferos, incluindo as células C3H10T1/2 (Zhang *et al.*, 1992).

### **1.3.1. Estrutura e Função das GJIC**

As conexões intercelulares tipo hiato são encontradas na membrana citoplasmática formando placas ou aglomerados de vários canais juncionais. Conexons (hemicanal) de membranas adjacentes se unem através de ligações não covalentes, em meio a um espaço intercelular muito estreito – hiato (de 35 Å), para formar canais juncionais completos. Subunidades de proteínas (conexinas) oligomerizadas e arranjadas de forma hexagonal, compõem a estrutura do hemicanal, que pode ser homomérico (formado por apenas um tipo de proteína) ou heteromérico (que contém mais de um tipo de conexina) (Beyer *et al.*, 1990, Kumar & Gilula, 1996).

Conexina (cx) corresponde a um termo genérico usado para designar uma família de proteínas, constituída de pelo menos treze membros já caracterizados em diversos tecidos de roedores, e com muitos genes homólogos identificados em outras espécies de vertebrados. Distingue-se os diferentes membros da família de conexinas através de sufixo numérico, que

designa a massa molecular estimada em kilodaltons (kDa), e que de uma forma geral varia entre 26 a 56 kDa (Bruzzone *et al.*, 1996).

A expressão gênica de conexinas é tecido-específica, com a maioria dos tecidos expressando mais de um tipo de conexinas. Assim, por exemplo, a cx 43, identificada primeiramente no músculo cardíaco (Beyer *et al.*, 1987), é encontrada em vários outros tecidos como músculo liso, fibroblasto, epitélios da córnea e cristalino do olho, bem como em células hepáticas não-parenquimatosas (Neveu *et al.*, 1994); cx 46 encontra-se nos rins e coração; cx 31 nos rins e pele; cx 32 e cx 26 no fígado, pâncreas e mucosa intestinal (Bruzzone *et al.*, 1996). A primeira conexina a ser clonada foi a cx 32 (Paul, 1986, Kumar & Gilula, 1986), a mais abundante das GJIC dos hepatócitos, onde também se identificou a cx 26 (clonada por Zhang & Nicholson, 1989), que está presente em menor proporção que a cx 32 (relação 1:10, respectivamente, no fígado de ratos) (Nicholson *et al.*, 1987). No fígado adulto, a cx 32 é expressa nos hepatócitos distribuídos ao longo dos ácinos hepáticos, e a cx 26 se restringe aos compartimentos periportais (Rosenberg *et al.*, 1992).

Conexinas apresentam similaridade estrutural entre si, variando entre 35 e 65%. Por exemplo, a homologia entre cx 32 e cx 26 é de 62%. Estudos topológicos mostram que oligômeros hexaméricos de conexinas se dispõem na membrana citoplasmática com regiões mais conservadas voltadas para a superfície extracelular (na forma de duas alças), sugerindo a existência de junções tipo hiato heterotípicas (conexons adjacentes formados por conexinas diferentes). Ao contrário, as seqüências de aminoácidos dos segmentos da molécula que são voltados para a superfície citoplasmática (uma alça central e as extremidades N- e C-terminal) variam significativamente entre conexinas diferentes (Goodenough *et al.*, 1996, Bruzzone *et al.*, 1996).

Conexões intercelulares tipo hiato foram descritas previamente como canais não-seletivos, que permitem a troca citossólica de íons e pequenas moléculas com um diâmetro máximo de 1,5 nm e com massa molecular de até 1-2 kDa (Simpson *et al.*, 1977). Entretanto, estudos em diferentes tecidos revelaram a existência de uma família multigênica de conexinas, com propriedades físico-químicas específicas (segundo o tamanho, carga ou conformação da molécula), que determinam uma diversidade potencial enorme de composição dos canais, gerando características diversas de

condutibilidade, permeabilidade e regulação. Assim, canais formados por diferentes conexinas podem ter permeabilidades distintas que permitem, por exemplo, a discriminação de mensageiros secundários tais como cAMP (AMP cíclico),  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{IP}_3$  (inositol 1,4,5-trifosfato), podendo modificar as respostas aos sinais de transdução intercelulares (Paul, 1995, Kumar & Gilula, 1996, Bruzzone *et al.*, 1996).

Sabe-se que GJIC são essenciais para o comportamento coordenado de células em tecidos e órgãos de organismos multicelulares. Desta forma, desempenham papel crítico na sincronização de atividades celulares como na contração coordenada dos músculos cardíaco e uterino, sendo igualmente essenciais na nutrição de tecidos avascularizados, como a córnea e o cristalino do olho. Além disso, existem evidências que sugerem um papel deste tipo de comunicação intercelular na regulação da morfogênese no embrião, e no controle da diferenciação e proliferação celulares (revisado por Yamasaki, 1990, Goodenough *et al.*, 1996). A possibilidade de transmissão de sinais que controlam a proliferação celular através das GJIC (hipótese proposta por Loewenstein, 1981), gerou outra hipótese de que a capacidade de comunicação reduzida resultaria em uma proliferação celular descontrolada, como ocorre na carcinogênese. Os resultados promissores alcançados ultimamente nesta área, associados à descoberta de doenças ligadas a mutações genéticas em genes que codificam para conexinas (Paul, 1995), indicam um potencial relevante das GJIC na prevenção e controle destas doenças (Kumar & Gilula, 1996).

Contudo, ainda existem muitas questões a serem elucidadas sobre a função e regulação dos canais intercelulares de conexinas. Os detalhes e a seqüência temporal das múltiplas etapas que envolvem a formação das placas juncionais tipo hiato, não estão totalmente esclarecidos (Laird, 1996, Goodenough *et al.*, 1996). Faz-se necessário esclarecer, por exemplo, os mecanismos envolvidos na síntese de conexinas e oligomerização em conexons, e outras modificações que estas proteínas devem sofrer, antes da chegada à membrana citoplasmática e formação de canais na superfície celular (Laird, 1996, Kumar & Gilula, 1996). Além disso, tem-se explorado a possibilidade de modulação da expressão gênica de conexinas, nos níveis transcricional e pós-transcricional (Kumar & Gilula, 1996), como um meio efetivo de regular a formação de GJIC.



### 1.3.2. GJIC e Carcinogênese

A relação entre GJIC e carcinogênese ficou estabelecida a partir das publicações de Loewenstein & Kanno (1966 e 1967), que relataram redução destas conexões entre células neoplásicas, sugerindo que junções intercelulares deficientes poderiam levar à proliferação celular desordenada observada no câncer. Desde então, tem-se gerado um considerável corpo de conhecimentos nesta área, através do uso de diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*.

Por um lado, sabe-se que as GJIC desempenham papel crucial no controle da homeostase dos tecidos, mantendo os sinais regulatórios da proliferação em equilíbrio entre as células conectadas (Yamasaki,1996). Por outro, a promoção da carcinogênese caracteriza-se por uma expansão clonal de células “iniciadas” ou proliferação desordenada de células potencialmente neoplásicas (transformadas), conseqüente à perda do controle homeostático (Trosko *et al.*,1990, Yamasaki & Naus,1996). De fato, o corpo de observações existentes evidencia uma forte associação entre proliferação celular durante o processo de carcinogênese e inibição de GJIC (Yamasaki *et al.*,1993, Trosko *et al.*,1994).

Assim, até o presente momento, existem algumas linhas de evidências que sustentam o papel essencial das GJIC alteradas na carcinogênese. São elas: redução das GJIC em células transformadas ou neoplásicas e, mais especificamente, falta seletiva de GJIC entre células transformadas e células normais do tecido adjacente; inibição das GJIC por agentes químicos promotores de câncer ou por oncogenes ativados, e ao contrário, restauração do acoplamento celular por inibidores de carcinogênese (Trosko *et al.*,1990, Krutovskikh *et al.*,1991, Mehta *et al.*,1991, Yamasaki & Naus,1996).

A primeira evidência da relação entre GJIC alterada e carcinogênese refere-se à observação de que quase todos os cânceres sólidos apresentam capacidade anormal de comunicação intercelular (revisado por Yamasaki , 1990). Além disso, sabe-se que não apenas células derivadas de diferentes cânceres, mas também células (de roedores e humanos) transformadas *in vitro* apresentam uma habilidade reduzida em estabelecer GJIC (Yamasaki & Katoh,1988, Krutovskikh *et al.*,1994, Cesen-Cummings *et al.*,1998).

No entanto, em alguns casos a transformação neoplásica não está associada a uma redução substancial de GJIC homólogas (acoplamento entre

células normais ou células transformadas), mas com uma perda seletiva de GJIC heterólogas (junções entre células transformadas e células normais adjacentes). Estes achados advêm de estudos *in vitro*, em diferentes linhagens de células transformadas co-cultivadas com suas correspondentes normais (Yamasaki *et al.*, 1987, Mesnil & Yamasaki, 1988, Esinduy *et al.*, 1995), bem como *in vivo*, em lesões hepáticas pré-neoplásicas e neoplásicas (em ratos e humanos) (Krutovskikh *et al.*, 1991, Krutovskikh *et al.*, 1994). Constatou-se, ainda, que a proliferação de células transformadas pode ser suprimida na presença de células normais, através do estabelecimento de GJIC heterólogas (Mehta *et al.*, 1986, Yamasaki & Katoh, 1988, Esinduy *et al.*, 1995). Assim, acredita-se que a supressão de GJIC heterólogas é fundamental para a manutenção e proliferação de fenótipos transformados durante o processo de carcinogênese (Yamasaki, 1990). Contudo, não está claro se a interrupção nas comunicações intercelulares é uma consequência ou causa da carcinogênese (Yamasaki, 1996).

Outra linha de evidências sobre o papel das GJIC na carcinogênese baseia-se na constatação de que agentes químicos promotores de câncer inibem GJIC, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, inclusive na carcinogênese hepática (revisado por Yamasaki & Naus, 1996). Neste último caso, Krutovskikh *et al.* (1995) observaram redução progressiva das GJIC durante a progressão da hepatocarcinogênese em ratos, induzida por quatro diferentes agentes promotores de câncer hepático. Em estudo recente (Ren *et al.*, 1998), constatou-se inibição de GJIC tecido-específica e dependente de proteína-quinase C, por ação de 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato ou de fenobarbital, em células epiteliais de fígado de rato ou em cultura de hepatócitos. O bloqueio da comunicação constitui, portanto, um mecanismo importante de ação da maioria dos promotores de câncer, favorecendo o processo de expansão clonal de células potencialmente neoplásicas. Sendo assim, tem-se proposto o índice de formação de GJIC como um método eficaz de detecção e caracterização de carcinógenos não-genotóxicos (Baker *et al.*, 1995, Yamasaki, 1996).

Da mesma forma, muitos genes envolvidos com a proliferação descontrolada do tecido neoplásico, denominados oncogenes, que codificam para fatores de crescimento ou seus receptores na superfície celular (ligados

à comunicação humoral extracelular), também inibem as GJIC (Trosko *et al.*, 1990, Jou *et al.*, 1995).

Ao contrário, observou-se que agentes quimiopreventivos induzem a formação de GJIC, como por exemplo, o ácido retinóico, em células transformadas *in vitro* (Yamasaki & Katoh, 1988), bem como *in vivo*, em carcinoma humano (Elias *et al.*, 1980). No entanto, estudos posteriores, em diferentes tipos de células de roedores e humanos, mostram que retinóides (retinol, ácido retinóico ou análogos sintéticos) podem tanto inibir quanto estimular as GJIC, em função da concentração do retinóide e/ou tipo de célula, e que a cinética dos efeitos observados é tipo celular-específica (Mehta *et al.*, 1989, Brümmer *et al.*, 1991, Guo *et al.*, 1992, Mercier *et al.*, 1993). Estes achados sugerem que a ação de retinóides nas GJIC pode ser mediada por diversos mecanismos.

Por outro lado, a modulação das GJIC durante a carcinogênese pode se dar em múltiplos pontos do processo de formação e acoplamento dos canais juncionais intercelulares. Têm-se identificado mecanismos genéticos e epigenéticos, tais como: mutações em genes que codificam para conexinas, expressão gênica anormal de conexinas, expressão reduzida das proteínas conexinas, localização anormal (citoplasmática) de conexinas, ou ausência de moléculas de adesão celular na membrana citoplasmática (revisado por Yamasaki *et al.*, 1995, Yamasaki, 1996).

Nesse sentido, tem-se observado que lesões hepáticas pré-neoplásicas ou neoplásicas apresentam um decréscimo expressivo de RNA mensageiro (mRNA) da cx 32, detectado através da técnica *northern blot* (Beer *et al.*, 1988, Fitzgerald *et al.*, 1989, Krutovskikh *et al.*, 1991, Neveu *et al.*, 1994, Tsuda *et al.*, 1995). Além disso, foi constatada uma expressão significativa do gene que codifica para a cx 43 em vários neoplasmas hepáticos (Oyamada *et al.*, 1990, Neveu *et al.*, 1994), e expressão da proteína cx 43 em carcinoma hepatocelular humano (Wilgenbus *et al.*, 1992). Entretanto, Yamasaki e seu grupo, em outros experimentos, não constataram qualquer alteração nas expressões das conexinas 32 e 43, em cânceres hepáticos humanos ou em fígado de ratos tratados com agentes promotores de câncer, mas observaram uma localização anormal (intracitoplasmática) destas proteínas (Krutovskikh *et al.*, 1994, Krutovskikh *et al.*, 1995). Vale acrescentar que o gene da cx 43 não é normalmente expressado nos

hepatócitos, mas apenas nas seguintes células não-parenquimatosas: células epiteliais biliares, células endoteliais e células ovais do fígado (Neveu *et al.*, 1994, Neveu *et al.*, 1995). Estes relatos evidenciam a existência de vários mecanismos de regulação da expressão gênica para conexinas durante o processo de hepatocarcinogênese.

Por fim, outro achado que reforça o papel das GJIC na carcinogênese refere-se à capacidade de suprimir crescimento e/ou carcinogenicidade, após transfecção e subsequente superexpressão de genes de conexinas, em células transformadas *in vitro* (Mehta *et al.*, 1991, Rose *et al.*, 1993) ou de carcinoma humano (Zhang *et al.*, 1998). Isto, associado ao fato de que diferentes cânceres apresentam inibição transcricional de genes de conexinas (Lee *et al.*, 1992, Yamasaki *et al.*, 1993, Fitzgerald *et al.*, 1994, Cesen-Cummings *et al.*, 1998), caracterizam estas proteínas como produtos de genes denominados supressores de câncer ou antioncogenes, da classe II, que refere-se ao gene que não está perdido ou mutado, mas inibido (Lee *et al.*, 1992, Yamasaki *et al.*, 1995).

### 1.3.3. GJIC e Beta-Caroteno

O papel dos carotenóides na formação das GJIC começou a ser investigado como um eventual mecanismo de ação na inibição da transformação neoplásica, propriedade exibida por estes compostos em estudo prévio *in vitro* (Pung *et al.*, 1988). Nesta mesma linha de investigação, Bertram e seu grupo haviam constatado que a ação de retinóides como inibidores de transformação, em células C3H10T1/2, estava correlacionada com a habilidade em estimular as GJIC (Hossain *et al.*, 1989). Dentre os carotenóides, focalizou-se a ação do  $\beta$ -caroteno sobretudo por apresentar maior atividade pró-vitamínica A, gerando a hipótese de que o carotenóide, como o retinol ou o ácido retinóico, poderia agir na inibição neoplásica através da expansão da comunicação intercelular dependente de conexinas.

De fato, Bertram e seu grupo observaram que o  $\beta$ -caroteno aumentou as GJIC entre fibroblastos em cultura, de forma dose- e tempo- dependente, e com maior intensidade que outros carotenóides (Zhang *et al.*, 1991). Além disso, constataram que para provocar um efeito semelhante aos retinóides era necessário mais tempo e maior concentração ( $10^{-5}$  M *versus*  $10^{-7}$  M para carotenóides e retinóides, respectivamente), achado sugestivo de conversão

metabólica de carotenóides a retinóides ativos. No entanto, também carotenóides sem atividade pró-vitamínica A conhecida em mamíferos, tais como cantaxantina e licopeno, estimulam a comunicação juncional *in vitro*.

Em trabalho mais recente, evidenciou-se que a ação dos carotenóides sobre as GJIC era dependente da presença de um anel de seis átomos de carbono na molécula (Stahl *et al.*,1997), sugerindo a ocorrência de bioconversão (enzimática ou química) a retinóides ativos, mesmo para aqueles compostos ditos sem atividade pró-vitamínica A (Sies & Stahl, 1997). No caso do  $\beta$ -caroteno, demonstrou-se que pelo menos parte da ação sobre as GJIC é mediada via retinóides (Acevedo & Bertram,1995).

Além disso, evidenciou-se que a ação do  $\beta$ -caroteno e de outros carotenóides *in vitro*, sobre as GJIC, é efetuada através da indução da expressão da cx 43, no nível transcricional, em fibroblastos de camundongo (Zhang *et al.*,1992), bem como no nível pós-transcricional, em fibroblastos humanos (Zhang *et al.*,1995) e em fibroblastos de camundongo e queratinócitos humanos (King *et al.*,1997), de maneira análoga ao ácido retinóico. Nesse sentido, existem relatos prévios da ação de retinóides sobre a expressão da cx 43, tanto *in vitro*, em fibroblastos de camundongo (Rogers *et al.*,1990), quanto *in vivo*, na pele humana (Guo *et al.*,1992). Contudo, ainda não se conhece a ação do  $\beta$ -caroteno, ou outros carotenóides, sobre a expressão de conexinas *in vivo*, nem sequer em modelo animal. O único relato disponível a esse respeito, não evidenciou uma ação efetiva do carotenóide na expressão gênica para cx 43, em amostras da mucosa do cólon de indivíduos normais e portadores de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas, tratados com  $\beta$ -caroteno (30 mg/dia) durante três meses (Frommel *et al.*,1994).

#### **1.4. DIFERENCIAÇÃO CELULAR, CÉLULAS OVAIS E HEPATOCARCINOGENESE**

Diferenciação celular constitui um processo biológico complexo e vital, uma vez que regula a expressão de um grande número de genes ligados a funções tecido-específicas e controla a proliferação celular. Compreende diversas etapas programadas geneticamente, incluindo a proliferação de células progenitoras ou células-tronco (*stem cells*), imortais e responsivas a estímulo mitogênico; a ativação e/ou repressão de inúmeros genes; a

expressão de proteínas de determinadas linhagens, que mediam funções biológicas específicas; a repressão progressiva da responsividade a fatores mitogênicos; e por fim, a diferenciação terminal completa, com perda irreversível do potencial proliferativo e imortalidade (revisado por Scott, 1997).

A carcinogênese, por sua vez, é um processo longo e complexo, caracterizado pela produção de clones de células com alterações genéticas e epigenéticas, comumente associadas com a expressão e função anormais de proto-oncogenes e/ou antioncogenes, que resultam, sobretudo, em perda do controle sobre a diferenciação e proliferação celulares. Estes clones exibem propriedades típicas de células que não sofreram diferenciação terminal completa, ou seja, mantêm a imortalidade e capacidade de responder a estímulo proliferativo. Segundo esta perspectiva, considera-se o câncer uma doença de diferenciação (Markert, 1968, Wille & Scott, 1986, Trosko *et al.*, 1990, Scott, 1997).

Vale acrescentar que o fígado contém dois tipos principais de células epiteliais diferenciadas: os hepatócitos, que estão localizados no parênquima hepático e representam cerca de 60% das células desse órgão, e as células epiteliais biliares, localizadas nos ductos biliares. A unidade estrutural e funcional do parênquima hepático é o ácino, organizado em formato de roda, sendo o aro delimitado por um conjunto de seis tríades ou espaços portais (vênula portal, arteríola hepática e ducto biliar) e o eixo central representado pela veia central ou vênula hepática terminal. Os raios da roda são formados por placas de hepatócitos, dispostas em cordões delimitados por sinusóides fenestrados. Os ácinos são divididos em três zonas: zona 1, ou periportal, zona 2 ou mediozonal (região intermediária) e zona 3, adjacente à veia central (Sigal *et al.*, 1992). Postula-se que as placas sinusoidais sejam linhagens de células hepáticas em processo de maturação, partindo-se de células progenitoras periportais (zona 1) para células maduras ou completamente diferenciadas (zona 3), com aspectos morfológicos, expressões gênica e antigênica, e potenciais proliferativo e diferenciativo, dependentes da idade ou posição ao longo da placa (Sigal *et al.*, 1992, Sell, 1993).

### 1.4.1. Células Ovais e Hepatocarcinogênese

Célula oval constitui um termo genérico usado para designar uma população de células epiteliais não-parenquimatosas, de pequeno tamanho (volume aproximado de 2/5 do hepatócito maduro), com citoplasma escasso e núcleo ovóide, que proliferam, no fígado de um organismo adulto, a partir da região da tríade portal e a seguir invadem o parênquima, durante as etapas iniciais da hepatocarcinogênese experimental e humana, ou na regeneração hepática após exposição a agentes tóxicos (Hixson *et al.*,1990, Lemire *et al.*, 1991, Faris *et al.*,1991, Hsia *et al.*,1992, Factor *et al.*,1994, Anilkumar *et al.*, 1995).

As células ovais foram descritas primeiramente por Opie (1944) e a terminologia “células ovais” introduzida por Farber (1956). Desde então, a presença destas células tem sido relatada em diferentes modelos de hepatocarcinogênese química experimental (Hixson *et al.*,1990). Particularmente, há cerca de duas décadas se tem postulado um papel das células ovais na regeneração e carcinogênese hepatocelulares, o que ainda persiste como uma questão de considerável controversia (Sell & Leffert, 1982, Sell & Dunsford, 1989, Sigal *et al.*,1992, Sell & Pierce,1994, Ponder, 1996).

A origem das denominadas células ovais também constitui um assunto polêmico. Todavia, evidências sugerem que no fígado de roedores adultos, as células ovais são derivadas de um compartimento de células progenitoras (*stem cells*), possivelmente localizado nos canalículos biliares terminais designados canais de Hering e/ou nas regiões periductulares (Sell & Dunsford,1989, Sell,1990, Lemire & Fausto,1991, Sigal *et al.*,1992, Factor *et al.*,1994).

As *stem cells* (células-tronco) são células progenitoras, multipotentes, responsáveis pela reposição celular em determinado órgão, com capacidade de se dividirem para produzir duas novas células – uma permanece como *stem cells*, enquanto a outra expressa um fenótipo mais diferenciado (Sell, 1993). Existem evidências da existência de células progenitoras multipotentes no fígado, que podem ser recrutadas para proliferação e subsequente diferenciação em várias linhagens hepatocelulares, após injúria severa do fígado ou exposição à carcinógenos (Sell,1990, Thorgeirsson,1996). Acredita-se que as células ovais, por sua vez, constituam o primeiro estágio de diferenciação das *stem cells* hepáticas (Sigal *et al.*,1992).

Sendo assim, as células ovais compreendem uma população de células imaturas, que expressam características de fenótipos antigênicos tanto de hepatócitos quanto de células do epitélio biliar, apesar de morfologicamente lembrarem estas últimas (Germain *et al.*,1988, Radaeva & Steinberg,1995, Tee *et al.*,1996, Hixson *et al.*,1997). Um achado bastante interessante refere-se ao fato de que as células ovais constituem uma população heterogênea, que contém linhagens celulares em estágios distintos de diferenciação (Hixson *et al.*,1990), na qual algumas células podem funcionar como células-mãe, com potencial para se diferenciar em hepatócitos e células epiteliais biliares (Evarts *et al.*,1987, Germain *et al.*, 1988, Evarts *et al.*,1989, Lemire *et al.*,1991, Factor *et al.*,1994, Golding *et al.*, 1995), e podem agir como precursoras de carcinomas hepatocelulares e colangiocarcinomas (Sell & Dunsford,1989, Faris *et al.*, 1991, Sell,1993, Ponder,1996).

Postula-se a existência, no fígado de mamífero adulto, de células ovais e células parenquimatosas em diferentes estágios do processo de diferenciação. Neste modelo, os hepatócitos menos diferenciados tenderiam a se localizar nas proximidades da região periportal (zona 1), e os hepatócitos completamente diferenciados, os quais não são, via de regra, responsivos a estímulo mitogênico, ficariam arranjados próximos ao centro do ácino hepático (zona 3) (Sigal *et al.*,1992, Sell,1993).

A reposição do parênquima hepático, após hepatectomia parcial, é feita basicamente por meio da proliferação dos hepatócitos remanescentes (hiperplasia compensatória); porém quando ocorre injúria severa com perda substancial da massa celular, como no caso de exposição a hepatocarcinógenos químicos, o fígado recruta as células progenitoras sobreviventes (Sigal *et al.*,1992, Thorgeirsson, 1996). Sugere-se que as células ovais sejam resistentes a carcinógenos, que por sua vez são citotóxicos (citostático e/ou necrosante) para os hepatócitos diferenciados, induzindo uma resposta regenerativa crônica das células progenitoras, bem como das precursoras intermediárias dos hepatócitos maduros, responsivas ao estímulo proliferativo. Este estado proliferativo crônico favoreceria a transformação destas células imaturas, que interrompem o processo de diferenciação em curso, tornando-se potencialmente neoplásicas (Hixson *et al.*,1990, Sigal *et al.*,1992, Sell & Pierce,1994).



Segundo esta perspectiva, o câncer se origina de células imaturas transformadas, que detêm potencial proliferativo e imortalidade por bloqueio irreversível do processo de diferenciação, em contraposição à teoria de que o câncer se desenvolve em consequência da “desdiferenciação” de células maduras (completamente diferenciadas). Esta visão alternativa da origem celular do câncer baseia-se no conceito de ontogenia bloqueada, proposto por Pierce & Johnson (1971), a partir da observação de que células neoplásicas expressam fenótipos representando estágios da ontogenia normal. Recentemente este conceito foi confirmado por Hixson *et al.*(1997), através do uso de marcadores fenotípicos em imuno-histoquímica: as células ovais e carcinomas hepatocelulares primários expressariam fenótipos que simulam estágios do desenvolvimento normal do fígado, e que células ovais transformadas e células de carcinomas são incapazes de completar a diferenciação para hepatócitos ou células epiteliais biliares.

Durante aproximadamente três décadas, o estudo da hepatocarcinogênese química experimental concentrou-se na análise de lesões pré-neoplásicas (focos e nódulos de hepatócitos), assumindo-se que carcinomas hepatocelulares são provenientes de nódulos que persistem meses após exposição a agentes carcinogênicos.

Contudo, tem-se acumulado um considerável corpo de evidências a favor da hipótese alternativa de que o carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma não se originam por “desdiferenciação” de hepatócitos maduros ou de células epiteliais biliares, respectivamente, mas por um processo anormal de diferenciação das células ovais (Sell & Dunsford, 1989, Hixson *et al.*,1990, Sell,1990, Sell & Pierce,1994, Ponder, 1996, Scott,1997). As evidências que fundamentam esta hipótese incluem: as células ovais apresentam expressão aumentada de oncogenes (Nagy *et al.*,1988, Braun *et al.*,1989, Imai *et al.*,1996); células ovais são capazes de se diferenciar em hepatócitos e células do epitélio biliar, *in vitro* e *in vivo* (Evarts *et al.*,1987, Germain *et al.*,1988, Lemire *et al.*,1991); células ovais apresentam fenótipos, tais como os antígenos OV-6 e OC.2, que são observados também em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, em modelos de hepatocarcinogênese (Hixson *et al.*,1990, Goyette *et al.*,1990, Evarts *et al.*,1990, Faris *et al.*,1991, Steinberg *et al.*, 1994); alguns protocolos experimentais de hepatocarcinogênese

induzem à proliferação de células ovais sem proliferação aparente de hepatócitos (Hixson *et al.*, 1990).

Mais recentemente, entretanto, relatos de estudos realizados por grupos de pesquisa distintos, em modelos de animais transgênicos, indicam que hepatócitos maduros têm um grande potencial proliferativo, e que hepatócitos não migram ao longo do ácino hepático (Rhim *et al.*, 1994, Bralet *et al.*, 1994, Kennedy *et al.*, 1995), em oposição à migração compensatória existente no sistema de linhagem celular, postulado para a reposição celular hepática (Sigal *et al.*, 1992). Além disso, relatos sugerem que tanto hepatócitos quanto células ovais podem se desenvolver para carcinoma hepatocelular ou colangiocarcinoma, bastando para tanto o acúmulo de um número suficiente de mutações genéticas (revisado por Ponder, 1996). Para ilustrar o quanto o tema é controverso, Anilkumar *et al.* (1995) constataram que focos e nódulos foram derivados de hepatócitos resistentes, e não de células ovais, que aparentemente se desenvolveram de forma independente das lesões pré-neoplásicas, no modelo do hepatócito resistente de carcinogênese experimental.

#### **1.4.2. Modelo AAF/PH de Diferenciação Celular Hepática**

Existem três modelos experimentais, através dos quais foi possível demonstrar, em animais adultos, a diferenciação de células ovais em hepatócitos (Everts *et al.*, 1987, Lemire *et al.*, 1991, Factor *et al.*, 1994). Dois desses modelos consistem na administração de um carcinógeno químico, combinada com hepatectomia parcial de 2/3, para promover a ativação, proliferação e diferenciação das denominadas células ovais. São eles: o modelo de hepatocarcinogênese induzida em camundongos pela droga alquilante dipina (1,4-bis [N,N' - di (etileno) - fosfamida] - piperazina) (Factor *et al.*, 1994), e o modelo AAF/PH ( 2-acetilaminofluoreno / hepatectomia parcial) (Everts *et al.*, 1987). O terceiro modelo, não-carcinogênico, compreende a administração de dose hepatotóxica de D-galactosamina, em ratos (Lemire *et al.*, 1991).

Estes sistemas experimentais baseiam-se no princípio segundo o qual, o processo de regeneração hepática via células ovais ocorrerá, se os hepatócitos remanescentes estiverem funcionalmente comprometidos e/ou forem incapazes de responder a estímulo proliferativo. Nestas condições, células que se encontram normalmente inertes no compartimento de *stem*

*cells*, são ativadas para produzir as células ovais descendentes, bem pouco diferenciadas ou imaturas. As células ovais proliferam extensivamente, gerando uma grande população de células que migram através do parênquima, local em que progênies de linhagens hepatocitárias se diferenciam em hepatócitos maduros, contribuindo para restaurar a massa celular hepática (Thorgeirsson,1996). Por outro lado, observa-se que apenas um estímulo proliferativo, mesmo sendo potente como a hepatectomia parcial a 70%, não promove a proliferação significativa de células ovais, o que se consegue associando à cirurgia, a administração de drogas citotóxicas.

O modelo AAF/PH corresponde ao modelo do hepatócito resistente (modelo RH) de hepatocarcinogênese (Solt & Farber,1976) modificado (Semple-Roberts *et al.*,1987), sem exposição ao agente iniciante (dietil - nitrosamina). Compreende, portanto, a administração de AAF a ratos isogênicos da linhagem Fischer 344 (com peso aproximado de 150 g), por via intragástrica, em nove doses (9 mg AAF/rato) distribuídas por duas semanas consecutivas, com hepatectomia parcial a 70% (entre a primeira e segunda semanas) (Evarts *et al.*,1987). O efeito antimitótico do AAF sobre os hepatócitos maduros, combinado com o estímulo proliferativo provocado pela perda maciça do parênquima hepático, induz a uma ativação do compartimento de células-tronco hepáticas. Assim, células ovais aparecem inicialmente nas áreas periportais cerca de dois dias após a hepatectomia parcial, e gradualmente invadem o ácino hepático. O pico de proliferação de células ovais é observado no período de 7 a 11 dias após a cirurgia. As células ovais se diferenciam em pequenos hepatócitos, e a regeneração do parênquima se completa por volta do 16º dia após a hepatectomia (Thorgeirsson *et al.*,1993, Nagy *et al.*,1994).

Observa-se ainda, no modelo AAF/PH, a formação de uma rede de ductos jovens (neoformados) que se difundem por todo o ácino hepático, bem como a presença esporádica de lesões pré-neoplásicas (focos de hepatócitos fenotipicamente alterados) (Evarts *et al.*,1987, Evarts *et al.*, 1989).

Tatematsu *et al.* (1984), ao utilizarem o modelo AAF/PH (originalmente descrito por esses autores), relataram um efeito antimitótico potente do AAF sobre os hepatócitos remanescentes, que persistiu até uma semana após o término da administração do AAF. Entretanto, os autores não evidenciaram a diferenciação das células ovais em hepatócitos. Posteriormente, Thorgeirsson

e seu grupo de pesquisadores, do Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos EUA, demonstraram *in vivo*, através deste modelo, uma relação precursor-produto entre as células ovais e os hepatócitos (Evarts *et al.*,1987). Assim, relataram que a marcação por timidina tritiada (administrada ao 6º dia após a hepatectomia) foi incorporada primeiramente pelas células ovais, e que, a partir do 9º dia após a cirurgia, foi transferida para pequenos hepatócitos presentes próximos àquelas, concluindo que a radioatividade observada nos hepatócitos foi derivada das células ovais. Estes resultados foram confirmados por outro estudo, onde se associou técnicas de marcação com timidina tritiada, e hibridização *in situ* com sondas (RNA) para albumina e  $\alpha$ -feto-proteína marcadas com  $^{35}\text{S}$  (Evarts *et al.*,1989).

Outro achado interessante, observado pela equipe de Thorgeirsson, através do uso de técnicas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, refere-se ao fato de que a proliferação de células ovais (positivas para o antígeno OV-6) na região periportal, e subsequente infiltração no parênquima hepático, é acompanhada por proliferação simultânea das células de Ito (células estelares, perisinusoidais, positivas para o antígeno desmina), que inclusive são células de depósito de vitamina A (Evarts *et al.*,1990). Mais ainda, constataram, de forma concomitante com o processo proliferativo, que as células de Ito apresentam aumento na expressão de fatores de crescimento, tais como TGF- $\alpha$  e - $\beta_1$  (fator de transformação do crescimento) e HGF (fator de crescimento de hepatócitos), envolvidos na regeneração hepática, sugerindo participação destes fatores na proliferação e diferenciação das células ovais (Evarts *et al.*,1990, Evarts *et al.*,1993, Hu *et al.*,1993).

Contudo, estudos relativamente mais recentes não evidenciaram a diferenciação de células ovais a hepatócitos no modelo AAF/PH, cujos dados sugerem reposição do parênquima hepático através da proliferação dos hepatócitos remanescentes (Gerlyng *et al.*,1994), ou a partir de células epiteliais de estruturas semelhantes a ductos (formam-se por todo a ácido hepático), que podem se diferenciar em hepatócitos (Golding *et al.*,1995).

### **1.5. BETA-CAROTENO, CONEXINAS E CÉLULAS OVAIS**

A diferenciação das células ovais em hepatócitos, anteriormente demonstrada por Evarts *et al.* (1987, 1989) no modelo AAF/PH, foi

posteriormente investigada, através da análise da expressão de conexinas, por meio da técnica *northern blot*, combinada com a análise da localização celular de transcritos (mRNA de conexinas), por hibridização *in situ* (Zhang & Thorgeirsson, 1994). Desse modo, os autores observaram que a proliferação das células ovais ocorre concomitantemente com o aumento na expressão da conexina 43, presente nas GJIC destas células, e que a cx 43 reduz a medida que as células ovais se diferenciam em hepatócitos. Isto ocorre simultaneamente com a normalização da expressão gênica para cx 32, no 16º dia após a hepatectomia. Neveu *et al.* (1995), também utilizaram a expressão de conexinas para estudar o processo de diferenciação fenotípica das células ovais em hepatócitos, obtendo resultados consistentes com aqueles relatados por Zhang & Thorgeirsson. Nesse sentido, os autores constataram que os pequenos hepatócitos, provavelmente derivados das células ovais e que apareceram no 11º dia pós-hepatectomia, expressam ambas as conexinas 32 e 26, e que houve uma transição na expressão da conexina 43 para as conexinas 32 e 26, durante o processo de diferenciação das células ovais.

Por outro lado, Moreno e colaboradores, em seus estudos de hepatocarcinogênese no modelo RH, observaram, por meio de análise histológica (hematoxilina e eosina - HE), redução na população de células ovais concomitante com um efeito inibitório sobre lesões hepáticas pré-neoplásicas, em animais tratados com  $\beta$ -caroteno, quando em comparação com ratos-controle ou tratados com vitamina A (Moreno *et al.*, 1991, Moreno *et al.*, 1995, Rizzi *et al.*, 1997). Estas observações foram confirmadas em outros trabalhos do grupo, por meio de análises imuno-histoquímicas, utilizando-se anticorpos anticitoqueratinas (AE1/AE3) e anti-GST-P (glutathione S-transferase, em sua forma placentária) para marcação e quantificação das células ovais (Dagli, 1994, Fiorio, 1998, Dagli *et al.*, 1998). Estes achados sugerem um papel do  $\beta$ -caroteno na diferenciação das células ovais, como um eventual mecanismo de ação quimiopreventiva do carotenóide sobre o processo de carcinogênese no fígado, uma vez que as células ovais podem dar origem ao câncer hepático.

Contudo, até o momento pouco se sabe sobre o papel do  $\beta$ -caroteno na diferenciação celular. Sendo assim, este estudo foi desenvolvido com o propósito de investigar os efeitos do carotenóide sobre o processo de

proliferação de células ovais (por marcação imuno-histoquímica com anticorpos anti-GST-P) e a expressão dos genes que codificam para as conexinas 43 e 32 (por *northern blot*), no sentido de contribuir para um maior entendimento do papel do  $\beta$ -caroteno na diferenciação celular. Para tanto, ratos Wistar foram tratados com  $\beta$ -caroteno ou vitamina A (como controle positivo) e submetidos ao modelo AAF/PH.

A hipótese principal que norteou este estudo é a seguinte: o  $\beta$ -caroteno favorece o processo de diferenciação das células ovais em hepatócitos, aumentando a expressão da conexina 43, o que poderia induzir a comunicação intercelular e a diferenciação terminal completa de células ovais ativadas, como um mecanismo de ação quimiopreventiva intrínseca do carotenóide na hepatocarcinogênese experimental.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar os efeitos do  $\beta$ -caroteno e da vitamina A sobre o processo de proliferação das células ovais, em modelo *in vivo* de diferenciação celular hepática.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

– Padronizar o modelo de diferenciação celular hepática descrito por Evarts *et al.* (1987) para ratos F-344 (modelo AAF/PH), adaptando-o para ratos Wistar.

– Caracterizar a cinética de proliferação das células ovais no modelo AAF/PH adaptado para ratos Wistar, através de análises histológica (hematoxilina e eosina) e imuno-histoquímica (com anticorpos anti-GST-P).

– Analisar a ação do  $\beta$ -caroteno e da vitamina A, na cinética da proliferação de células ovais, por meio de análises histológicas (HE) e imuno-histoquímicas (GST-P), no modelo AAF/PH.

– Avaliar as expressões dos genes que codificam para as conexinas 43 (de células ovais) e 32 (de hepatócitos), através da técnica *northern blot*, em fígado de ratos tratados com  $\beta$ -caroteno ou vitamina A, e submetidos ao modelo de diferenciação de células ovais em hepatócitos (modelo AAF/PH).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 156 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, linhagem Wistar, var. albinos (*Rodentia mammalia*), pesando entre 47 e 70 g (peso médio inicial de  $58,6 \pm 7,83$  g), provenientes do setor de criação do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em uma sala específica para experimentação, localizada no referido biotério, sob as seguintes condições ambientais controladas: iluminação – ciclo claro/escuro de 12 h (controlado por *timer*); temperatura –  $23 \pm 2$  °C (mantida através de aparelho de ar condicionado); ventilação – circulação forçada de ar (por meio de exaustor). Os ratos foram alojados em caixas de polipropileno, em número de no máximo 4 por caixa, e consumiram água destilada e ração balanceada (Labina - Purina Nutrimentos Ltda.) *ad libitum*, por dois dias em que foram mantidos em adaptação, e no decorrer de todo o experimento. Os animais foram pesados em dias alternados, durante todo o ensaio biológico, e o controle do consumo de ração foi efetuado semanalmente, no período que precedeu a hepatectomia parcial. As pesagens foram realizadas em balança eletrônica digital (marca Acatec, modelo BED 5000, com precisão de 0,1 g).

#### 3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

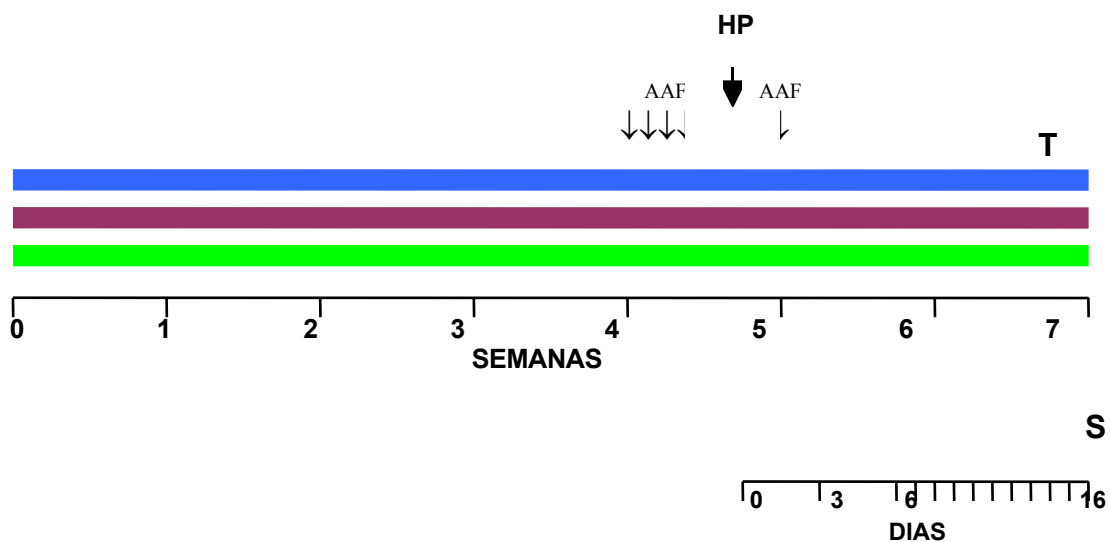
Os animais foram submetidos ao modelo de diferenciação de células ovais em hepatócitos (modelo AAF/PH), descrito por Evarts *et al.* (1987), que corresponde ao modelo do hepatócito resistente (modelo RH) de carcinogênese, modificado (Semple-Roberts *et al.*, 1987), adaptado para ratos Wistar (Moreno *et al.*, 1991), sem a administração do agente iniciante, conforme esquema ilustrado na figura 1.

Ao início do experimento, os animais foram distribuídos em três grupos (52 ratos / grupo), utilizando-se a técnica de delineamento por blocos casualizados, em função do peso dos animais, e a partir de então, tratados, por via intragástrica e em dias alternados, durante todo o experimento (até sete semanas, conforme o dia do sacrifício), com  $\beta$ -caroteno - grupo BC (*trans-beta-carotene type I*, Sigma, 70 mg/kg de peso corpóreo, dissolvido



em óleo de milho), ou com vitamina A - grupo VA (acetato de retinila, Merck, 10 mg/kg em óleo de milho), ou com óleo de milho - grupo CO (grupo controle) que recebeu óleo nas mesmas quantidades que os ratos dos grupos BC e VA, ou seja, 2,5 mL/kg de peso corpóreo. Quatro semanas após o início do experimento, administrou-se, por via intragástrica, o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF, Sigma A-2269), dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) e em óleo de milho, na dosagem de 20 mg/kg de peso corpóreo, por quatro dias consecutivos. No dia seguinte à quarta dose de AAF, os animais foram submetidos à hepatectomia parcial (HP) a 70%. No segundo e quarto dias após a HP, foram administradas mais duas doses de AAF, totalizando seis doses (6 x 20 mg/kg de peso) por animal (Figura 1).

Por ocasião da hepatectomia parcial os animais foram distribuídos, ao acaso (delineamento por blocos casualizados), dentro de cada grupo experimental, em 13 subgrupos, para o sacrifício, conforme os dias 0, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 após a HP (Figura 1), contendo 4 animais por subgrupo. Os ratos foram sacrificados sempre no período da manhã, após jejum de 12 h, por exsanguinação sob anestesia com éter. Ao sacrifício, foram colhidas amostras de fígado de cada animal para análises histológicas e imuno-histoquímicas, bem como para a extração de RNA e determinação das concentrações hepáticas de  $\beta$ -caroteno e vitamina A. Nestes dois últimos casos, fragmentos de cerca de 1 g do lobo anterior direito do fígado, foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e a seguir, estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



HP - hepatectomia parcial (a 70%)

AAF - 2-acetilaminofluoreno, 6 x 20 mg/kg de peso corpóreo (via intragástrica)

T - tratamento (via intragástrica, em dias alternados) :

— grupo controle (CO) - óleo de milho (2,5 mL/kg de peso corpóreo)

— grupo  $\beta$ -caroteno (BC) -  $\beta$ -caroteno (70 mg/kg de peso corpóreo)

— grupo vitamina A (VA) - vitamina A (10 mg/kg de peso corpóreo)

S - dias de sacrifício, após HP

FIGURA 1. Representação esquemática do protocolo experimental

### 3.3. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE BETA-CAROTENO E VITAMINA A

As concentrações hepáticas de  $\beta$ -caroteno e vitamina A (retinol e palmitato de retinila) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseando-se na técnica descrita por Arnaud *et al.* (1991), sendo utilizados solventes grau-HPLC. Para tanto, as amostras foram extraídas dos fragmentos de fígado (cerca de 1g), conforme procedimento a seguir, adaptado de Stahl *et al.* (1993): homogeneização em agitador mecânico, com 2 mL de etanol por 2 min; agitação em agitador de tubos acrescentando-se 2 mL de n-hexano, durante 2 min; centrifugação a 10 000 rpm por 10 min (centrífuga Sorvall, modelo RC5C, rotor SS34); secagem do sobrenadante em atmosfera de nitrogênio; resuspensão na fase móvel.

A análise das amostras foi realizada em cromatógrafo (Shimadzu, modelo LC9A) com sistema de bombeamento para multissolventes, auto-injetor (SIL-6B) e detector UV-VIS (SPD-M6A), utilizando-se coluna de fase

reversa C18 (CLC-ODS; 5  $\mu$ m, 6 mm ID x 15 cm) protegida por uma coluna de guarda (CLCG-ODS). O detector foi ajustado em 450 nm para detecção de  $\beta$ -caroteno, e em 325 nm para detecção de retinóides. Alíquotas de 20  $\mu$ L de amostra foram injetadas no cromatógrafo e os compostos ( $\beta$ -caroteno e vitamina A) foram eluídos (fluxo de 1,5 mL/min) usando-se a mesma fase móvel – acetonitrila : diclorometano : metanol ( 20:20:10). O tempo de retenção foi de 12,5 min para  $\beta$ -caroteno, 2,9 min para retinol e 13,1 min para palmitato de retinila.

O  $\beta$ -caroteno e os retinóides foram identificados por comparação dos tempos de retenções com aqueles dos respectivos padrões, sendo quantificandos através das áreas dos picos. A pureza dos padrões (Merck) foi verificada por meio de espectrofotômetro (Beckman, modelo DU70), obtendo-se taxas de recuperação em torno de 91 %, 95 % e 93 % para o  $\beta$ -caroteno, retinol e palmitato de retinila, respectivamente.

### **3.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA**

#### **3.4.1. Preparo do Material**

Fragmentos com aproximadamente 5 mm de espessura, representativos de cada lobo hepático, foram colhidos e em seguida colocados em solução metacarn ( metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético glacial 10%, P.A.) para fixação do material, por 48 h. Após este período, os fragmentos foram submetidos às técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. A partir desse material foram preparados cortes de 5  $\mu$ m de espessura, que foram aderidos em lâminas histológicas previamente desengorduradas, e então corados pela hematoxilina de Harris e eosina (HE).

#### **3.4.2. Avaliação Morfológica**

Após secagem dos cortes e montagem com resina histológica, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus, Japão), observando-se a presença das células ovais, segundo a localização e a cinética da proliferação, nos diferentes tempos e tratamentos considerados no protocolo experimental (Figura 1).

### 3.5. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

#### 3.5.1. Preparo do Material

As técnicas utilizadas para a obtenção e fixação dos fragmentos de fígado e para o preparo e adesão dos cortes histológicos em lâminas foram as mesmas descritas previamente no item 3.4.1.

#### 3.5.2. Marcação com GST-P

A enzima GST-P (glutathione S-transferase, em sua forma placentária), amplamente utilizada em imuno-histoquímica para identificar lesões pré-neoplásicas, é expressada nas células ovais, podendo, por conseguinte, ser usada como um marcador imunológico destas células (Satoh *et al.*,1985, Evarts *et al.*,1990, Imai *et al.*,1997). Nesse sentido, foram utilizados os procedimentos descritos a seguir, adaptados daqueles relatados por Tatematsu *et al.* (1988). Cada procedimento foi intercalado com lavagem da lâmina em solução salina, tamponada com tampão sódio-fosfato (PBS).

– Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em seqüência de álcoois (absoluto, a 95% e a 70%) e lavados em água destilada.

– Para bloquear a peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas por 30 min em metanol (P.A.) contendo 50% de peróxido de hidrogênio 30 volumes (P.A.).

– Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários, ou seja, anticorpos policlonais anti-GST-P de coelho (MLB,Japão), durante uma noite a 4 °C, em câmara úmida. Os anticorpos primários foram utilizados na diluição 1 : 4 000, tendo sido diluídos em solução contendo soro-albumina (albumina bovina fração V [Sigma A-2153]) a 5% em água destilada (1,25 mL), azida sódica (P.A.) a 5% em água destilada (2,5 mL), e PBS (59 mL).

– A seguir, incubou-se os cortes com anticorpo secundário anti-imunoglobulinas de camundongo/coelho (Strept ABCComplex /HPR, Duet, mouse/rabbit, DAKO K0492, Dinamarca), conjugados à biotina, durante 30 min, seguindo-se a aplicação do conjugado estreptoavidina-biotina-peroxidase (incubação por 30 min), de acordo com método descrito por Hsu *et al.* (1981). Nos dois casos utilizou-se diluição 1:400, em PBS.

– Após, aplicou-se sobre os cortes solução de substrato de peroxidase (peróxido de hidrogênio a 0,02% e diaminobenzina [3,3'- diamino-benzine, Sigma] a 0,1% diluídos em PBS), preparada imediatamente antes da utilização.

– Os cortes foram lavados rapidamente em PBS e em água destilada, e em seguida contracolorados pela hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina histológica.

### **3.5.3. Avaliação Morfométrica**

Para a avaliação morfométrica de estruturas periportais (células ovais) positivas para a GST-P, utilizou-se o sistema computadorizado de análise de imagem do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Este compreende um microscópio óptico (Olympus, Japão) acoplado a uma câmera de vídeo, que se conecta a um microcomputador AT-486 equipado com uma placa digitalizadora e com o programa *Bioscan Optimas* (Copyright Aldus Corp., versão 4.1, 1987-1993). As células ovais foram quantificadas mediante a técnica de estimativa do volume celular por pontos coincidentes, adaptada de Weibel (1963). Para tanto, acoplou-se à tela do monitor uma folha transparente contendo 100 pontos, plotados distantes 2 cm um ponto do outro. Em cada lâmina analisou-se 15 regiões periportais consideradas como áreas de proliferação de células ductulares, em espaços-porta alternados, e no corte referente ao lobo anterior direito, computando-se os pontos coincidentes com estruturas periportais (células ovais) positivas para GST-P. Os resultados foram expressos em fração de volume celular (%) de zonas periportais, conforme descrito por Dagli *et al.* (1998).

### **3.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR NORTHERN BLOT**

A técnica *northern blot* foi utilizada para avaliação das expressões dos genes das conexinas 43 e 32, através da análise do mRNA (RNA mensageiro) ou transcritos desses genes, os quais constituem marcadores moleculares de células ovais e hepatócitos, respectivamente. Esta técnica, que é derivada do *southern blot* (análise de DNA) (Southern, 1975), compreende um grande número de procedimentos, que podem ser agrupados em duas etapas principais, ou seja, obtenção e preparo do RNA

total (extração, separação, transferência e fixação em membrana) e hibridização – da sonda com o mRNA contido na membrana (preparo e marcação de sondas, pré-hibridização, hibridização e revelação). Cada etapa foi cuidadosamente padronizada através da adaptação de técnicas descritas por Chomczynski & Sacchi (1987), para extração de RNA total, e por Sambrook *et al.* (1989). A padronização foi então redigida na forma de um manual, para ser usado na rotina do Laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Todos os procedimentos descritos neste item foram realizados tomando-se o cuidado necessário com a limpeza do ambiente e dos materiais (esterilizados a seco [ forno a 200 °C por 8 h] ou a vapor [ autoclavagem a 121 °C por 20 min]) e com a pureza dos reagentes (grau - biologia molecular) e das soluções, bem como das amostras, sempre mantidas sob refrigeração durante a execução das técnicas, evitando-se assim a contaminação e degradação do RNA. Toda a manipulação envolveu o uso de luvas cirúrgicas, que eram trocadas freqüentemente, e toda água utilizada, em soluções e procedimentos em geral, era ultrapura, esterilizada e tratada com DEPC (dietil pirocarbonato, Sigma D-5758) a 0,1%.

### **3.6.1. Obtenção e Preparo do RNA Total**

Esta etapa inclui a extração do RNA total, separação por eletroforese e transferência e fixação do RNA em membrana, conforme descrição a seguir.

#### **3.6.1.1. Extração do RNA total**

O RNA total foi isolado de acordo com o método AGPC (Chomczynski & Sacchi,1987), ou seja, extração com tiocianato de guanidina, fenol e clorofórmio. Para tanto, cerca de 500 mg de fígado, pesados em balança eletrônica digital (marca Acatec, modelo BCM 1100, com precisão de 0,001g) foram triturados em agitador mecânico (FANEM / Tecnal, modelo 256) com 5 mL de solução de tiocianato de guanidina (tiocianato de guanidina [Sigma G-9277] - 50 g; citrato de sódio [Sigma C-8532] 0,75 M, pH 7,0 - 3,52 mL; lauroilsarcosil [Sigma L-9150] a 10 % - 5,28 mL; água com DEPC - 58,6 mL) e mercaptoetanol (Sigma M-3148) a 0,7 %. Após, adicionou-se 0,5 mL de acetato de sódio (Sigma S-2889) 2 M, pH 4,0; 5 mL de fenol (Sigma P-1037)

saturado em água; e 1 mL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (Sigma I-9392) (49:1); centrifugou-se a 9 500 rpm por 30 min a 4°C (centrífuga Sorvall, modelo RC5C, rotor SS34), coletando-se o sobrenadante. O RNA contido no sobrenadante foi então precipitado com etanol absoluto (Merck, P.A.), e o precipitado, obtido após dois ciclos de centrifugação, foi lavado com etanol a 75 %, e resuspendido com solução de SDS ( duodecil sulfato de sódio [Sigma L-4390]) a 0,5 %, até volume máximo de 400 µL. A concentração final de RNA nas amostras foi estimada através de leitura em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-3410) no comprimento de onda de 260 nm, em que 1 OD<sub>260</sub> corresponde a 40 µg de RNA. A integridade do RNA foi monitorada mediante separação por eletroforese em mini-gel de agarose (Sigma A-9539) a 1 %, usando-se como padrão RNA ribossomal (18 S e 28 S, Sigma R-0889).

#### 3.6.1.2. Separação do RNA total por eletroforese

O RNA total foi separado por eletroforese, conduzida sob uma tensão de 20 V, por cerca de 10 h, em gel de agarose a 1 %, sob condições desnaturantes (gel contendo formaldeído [ Sigma F-8775 ] a 17,7 % ), em sistema de recirculação de tampão MOPS 1X ( MOPS 10 X - MOPS [3-{N-morfolino} ácido propanosulfônico, Gibco 11345-022] 200 mM; acetato de sódio 50 mM; EDTA [Gibco 15576-028] 10 mM). Alíquotas de 15 µL de RNA foram previamente aquecidas em banho-maria a 65 °C por 20 min; diluídas em solução contendo MOPS 1 X, formaldeído a 17,7 % e formamida (Sigma F-7508) a 50 %; aquecidas novamente a 55 °C por 15 min e em seguida, pipetadas no gel. Usou-se como padrão RNA *Ladder* (0,24-9,5 kb, Gibco 15620-016).

#### 3.6.1.3. Transferência e fixação do RNA total

Após a eletroforese o gel foi lavado em banhos (sob agitação), conforme seqüência a seguir: água com DEPC, durante 10 min (por duas vezes); solução de NaOH (NaCl 0,15 M e NaOH 0,05 N), por 30 min; solução de Tris ( NaCl 0,15 M e Tris [trizma base - tris {hidroximetila} aminometano - Sigma T-8524] 0,1 M, pH 7,5 ), por 30 min; água com DEPC, por 10 min; solução de SSC 20 X (citrato de sódio [82,2 g] e cloreto de sódio [175,3 g] em 1 000 mL de água com DEPC) pH 7,0 , durante 45 min. Para a transferência,

o gel foi colocado em contato com a membrana de nitrocelulose com suporte (Sigma, W-8248), que foram dispostos entre papéis 3mm para cromatografia (Whatman 3030917), e acima deste conjunto, montou-se uma “torre” com guardanapos de papel, mantidos sob pressão (com auxílio de um peso de 500 g) durante aproximadamente 16 h. Após este período, o RNA foi fixado por incubação da membrana a 80 °C por 2h, em estufa a vácuo (pressão - 25 mmHg). A membrana foi armazenada sob refrigeração (cerca de - 4 °C) para posterior hibridização, após separação do RNA padrão. Este foi corado com azul de metileno 0,04 % em tampão de acetato de sódio 0,5M (pH 5,2), para revelação do mesmo, que foi usado para identificação dos transcritos hibridizados.

### 3.6.2. Hibridização

Este item compreende as seguintes etapas: obtenção e marcação das sondas de cDNA (DNA complementar dos genes em estudo) com  $^{32}\text{P}$ , pré-hibridização e hibridização do RNA imobilizado em base sólida (membrana de nitrocelulose com suporte), e revelação por auto-radiografia.

#### 3.6.2.1. Obtenção e marcação das sondas de cDNA

Os cDNAs das conexinas 32 (inserido no plasmídeo pGEM-3) e 43 (inserido no plasmídeo BSKS+) foram fornecidos gentilmente pelo Dr. David L. Paul, do Departamento de Neurobiologia da Faculdade de Medicina de Harvard, Boston, EUA (Paul,1986, Beyer *et al.*,1987). Os cDNAs foram isolados de acordo com os seguintes procedimentos : digestão do plasmídeo com enzima de restrição Eco RI (incubação a 37 °C por 16 h); separação do digerido por eletroforese (a 70 V por cerca de 2 h) em gel de agarose a 1 % e sistema de recirculação de tampão TPE (trizma base 0,36 M;NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 M; EDTA 0,1 M); lavagem com clorofórmio e fenol:clorofórmio (1:1); extração com acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e etanol absoluto ; e por fim resuspensão do precipitado em tampão TE (tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0), pH 7,6. Estimou-se a concentração da solução final de cDNA através da comparação da banda da amostra em relação às bandas do padrão (DNA Hind III, Pharmacia), após separação por eletroforese em mini-gel de agarose a 1 %.



As sondas (cerca de 100 ng de cDNA da cx 32 e da cx 43) foram marcadas com  $^{32}\text{P}$  - dCTP (Amersham AA0075), utilizando-se o conjunto de marcação *multiprime DNA labelling system* (Amersham RPN.1601Z) contendo iniciador (*primer*), nucleotídios e enzima. Após incubação por uma noite à temperatura ambiente, as sondas marcadas com  $^{32}\text{P}$  foram purificadas utilizando-se colunas descartáveis (Nick *column*, Sephadex G-50, Pharmacia / Biotech 17-0855-02), e tampão TE, pH 7,6. A segunda fração eluída da coluna, correspondente à sonda marcada com  $^{32}\text{P}$ , foi reservada para posterior hibridização, depois da retirada de uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  para contagem da radioatividade contida nesta fração, em cintilador líquido (Tri-Carb 1600 TR, Packard). Considerou-se atividade específica satisfatória a partir de  $1 \times 10^9$  cpm/ $\mu\text{g}$  de sonda.

#### 3.6.2.2. Pré-hibridização

A membrana foi submetida a um banho em solução de pré-hibridização (formamida [Sigma F-7508] a 50 %; SSC 6X; denhardt 5X [denhardt 50X = 5 g de ficoll { Pharmacia 17-0400-01}, 5 g de polivinil- pirrolidona {Sigma P-5288}, 5 g de albumina bovina fração V, diluídos em 500 mL de água ultra-pura]; SDS a 0,5 % e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [Sigma S-3264] 0,1 M) a 42 °C durante uma noite, em forno de hibridização (Hybridiser HB-2D, Tecne/UNN Uniscience do Brasil). Acrescentou-se ao banho de pré-hibridização, uma solução de DNA (Herring Sperm DNA, Gibco 15634-017), na concentração final de 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de solução, para bloquear a membrana contra ligações inespecíficas da sonda de hibridização.

#### 3.6.2.3. Hibridização

Após a pré-hibridização, procedeu-se à hibridização da membrana, acrescentando-se à solução de pré-hibridização, a solução contendo a sonda (após 10 min de fervura). A hibridização foi conduzida em forno de hibridização, à temperatura constante de 42 °C por cerca de 50 h.

#### 3.6.2.4. Revelação por auto-radiografia

Em seguida à hibridização, a membrana foi submetida a banhos (sob agitação) com diferentes capacidades de estringência, para retirar o excesso de radioatividade, sem prejudicar a hibridização das sondas de cDNA com o

mRNA contido na membrana. Para tanto, usou-se a solução I (SSC 2X e SDS a 0,5 %) e II (SSC 2X e SDS a 0,1 %) à temperatura ambiente, por 5 e 15 min, respectivamente. Após, conforme a radioatividade remanescente na membrana, medida através de um contador *Geiger* (Victoreen, modelo 190), a mesma era submetida a um ou mais banhos com a solução III (SSC 0,1X e SDS 0,5 %) a 52 °C, durante 2 a 10 min. A seguir, a membrana, envolvida em filme de PVC, foi exposta (em câmara escura) a filme de raio-X (Kodak X-OMAT, 6497903) em chassi radiográfico (*X-ray exposure holder*, Kodak/Sigma E-9010) contendo tela intensificadora, a -70 °C durante um tempo variável (1 a 2 dias para cx 32 e 3 a 4 dias para cx 43). Após a exposição, os filmes de raio-X foram revelados (em câmara escura) usando-se revelador e fixador Kodak-GBX. Os sinais identificados por autoradiografia, correspondentes às áreas da membrana hibridizadas com as sondas de cDNA, foram analisados em sistema de análise densitométrica do Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. O referido sistema consiste em um densitômetro (Bio-Rad, modelo GS-700), conectado a um microcomputador equipado com o programa *Molecular Analyst* (Bio-Rad's *Image Analysis Systems*, versão 1.4).

As áreas da membrana hibridizadas com as sondas de cDNAs das conexinas 32 e 43, reveladas por autoradiografia, foram identificadas através de comparação com o RNA padrão (corado com azul de metileno conforme descrição no item 3.6.1.3), e o cDNA de  $\beta$ -actina (Oncor P 7000, USA) foi usado como um controle da quantidade de amostra hibridizada.

### **3.7. METODOLOGIA ESTATÍSTICO-EXPERIMENTAL**

Na presente investigação, o delineamento experimental foi o de blocos casualizados, compreendendo 3 tratamentos, 13 pontos por tratamento, e 4 repetições por ponto e tratamento, conforme descrito no item 3.2. Os resultados obtidos a partir de dados quantitativos estão expressos sob a forma de média e desvio-padrão da média (média  $\pm$  D.P.). Quando indicado, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste F. Para avaliar a significância estatística das diferenças entre médias, empregou-se o Teste *t* de Student para amostras não-pareadas (Gad & Weil, 1989). Os

cálculos estatísticos foram efetuados em microcomputador AT-486 equipado com o programa *INSTAT* (*GraphPad Software*, versão 2.01, 1990-1992).

### **3.8. PADRONIZAÇÃO DA FORMA DE APRESENTAÇÃO DESTA TESE**

As características gerais de formatação (formato da página de rosto e do sumário, configuração de página e numeração, formato e tamanho de letra, espaçamento entre linhas), utilizadas no presente documento, baseiam-se nas diretrizes estabelecidas pela Comissão de Pós-Graduação (CPG) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

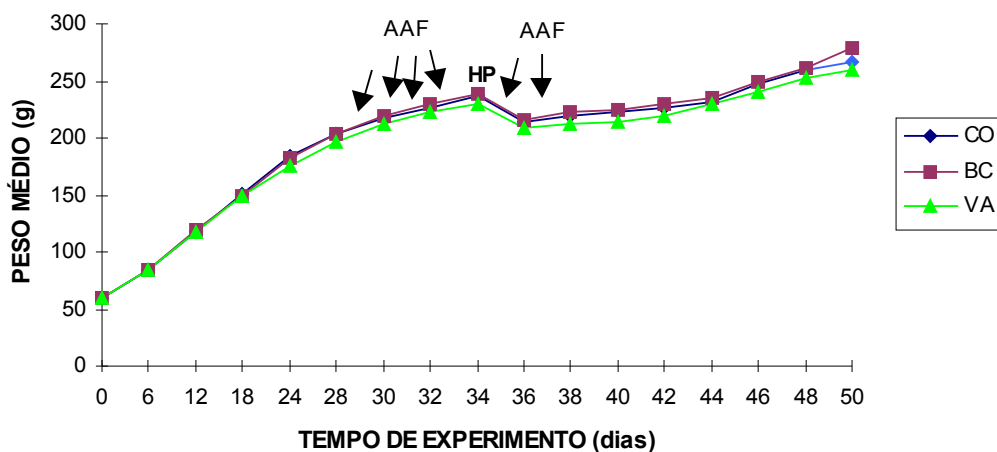
As citações bibliográficas indicadas no corpo do relatório estão de acordo com a norma NBR-10520/1988 (Apresentação de citações em documentos), da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), e a lista de referências bibliográficas foi redigida conforme a norma NBR-6023/1989 (Referências bibliográficas)/ABNT. Os títulos dos periódicos listados nas referências bibliográficas foram abreviados segundo o *Chemical Abstracts Service Source Index* (CASSI, 1995, ISSN 0001-0634), e a grafia das unidades de medidas indicadas no texto, segue as diretrizes estabelecidas no SI (*Système International d'Unités*), conforme descrito por Young (1990).

## 4. RESULTADOS

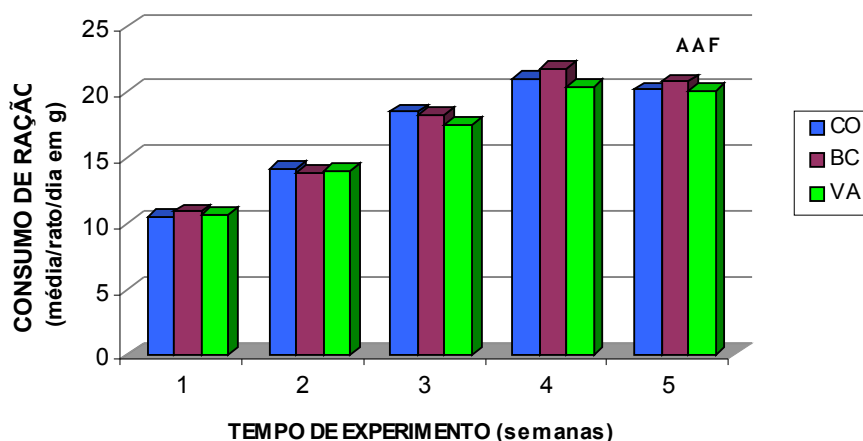
### 4.1. EVOLUÇÃO DE PESO E CONSUMO DE RAÇÃO

Os três grupos de animais constituídos para o ensaio biológico, apresentavam, ao início do estudo, pesos médios semelhantes, de 59 g ( $58,6 \pm 7,89$  g;  $58,7 \pm 7,97$  g;  $58,6 \pm 7,79$  g, para CO, BC e VA, respectivamente). Da mesma forma, a evolução do peso dos animais no decorrer do experimento, evidencia curvas de peso similares entre os grupos de ratos, conforme o gráfico mostrado na Figura 2. Esses dados são relativos a 52 animais por grupo experimental, até a hepatectomia; após, o número de animais é variável e gradativamente menor conforme o sacrifício de 4 ratos/tempo (dias pós-HP) / tratamento. Por ocasião da primeira dose de AAF, os animais pesavam em média  $201,9 \pm 23,36$  g ( $203,38 \pm 21,04$  g;  $203,92 \pm 24,45$  g e  $196,37 \pm 25,20$  g; para os grupos CO, BC e VA, respectivamente). Observa-se que no período compreendido entre a primeira e a última dose de AAF - durante as intervenções relativas ao modelo AAF/PH (administração da droga e cirurgia com ressecção de 2/3 do fígado), o crescimento foi desacelerado, resultando em manutenção de peso nesta fase. Após as referidas intervenções, os animais voltaram a ganhar peso, retomando o crescimento durante o período de sacrifício (entre o zero e 16 ° dias após hepatectomia), de forma similar entre os grupos experimentais (Figura 2).

O tratamento com  $\beta$ -caroteno ou vitamina A também não influenciou o consumo de ração, uma vez que este foi semelhante entre todos os grupos experimentais, e gradativamente maior com a evolução do tempo de experimento (Figura 3). Observa-se que durante a quinta semana do ensaio biológico, no período em que foram administradas as quatro primeiras doses de AAF (antes da hepatectomia), o consumo de ração estabilizou-se, ou foi ligeiramente reduzido. Constatou-se um consumo médio diário de ração por rato de 10,7 g , 14,0 g , 18,1 g , 21,1 g e 20,4 g , respectivamente na primeira, segunda, terceira, quarta e quinta semanas do experimento.



**FIGURA 2.** Evolução do peso de ratos Wistar tratados com óleo de milho (CO – controle),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), e submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular hepática. AAF: 2-acetilaminofluoreno. HP: hepatectomia parcial.



**FIGURA 3.** Consumo de ração de ratos Wistar tratados com óleo de milho (CO),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), e submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular hepática. AAF: 2-acetilaminofluoreno.

#### 4.2. CONCENTRAÇÕES HEPÁTICAS DE BETA-CAROTENO E VITAMINA A

Na Tabela 1 estão apresentadas as concentrações hepáticas de  $\beta$ -caroteno, retinol e palmitato de retinila, de ratos Wistar submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular, e tratados durante todo o experimento (mínimo de cinco semanas consecutivas, conforme o dia do sacrifício), por via intragástrica, em dias alternados, com óleo de milho (grupo CO –

controle),  $\beta$ -caroteno (grupo BC) ou vitamina A (grupo VA). Determinaram-se as concentrações de  $\beta$ -caroteno, retinol e palmitato de retinila nos fígados dos animais sacrificados nos tempos zero, 7°, 11° e 16° dias pós-hepatectomia.

Observa-se que o grupo BC apresentou concentrações hepáticas de  $\beta$ -caroteno significativamente maiores ( $p < 0,01$ ) que aquelas dos demais grupos experimentais (cerca de vinte vezes em relação ao grupo CO e de dez vezes em relação ao grupo VA), em todos os tempos de sacrifício considerados, conforme ilustração gráfica na Figura 4. Além disso, o conteúdo de  $\beta$ -caroteno do grupo VA foi significativamente maior que aquele do grupo CO, nos tempos zero ( $p < 0,05$ ) e sétimo dia após HP ( $p < 0,01$ ).

Por outro lado, o grupo VA apresentou concentrações hepáticas de vitamina A (retinol e palmitato de retinila) significativamente maiores ( $p < 0,01$ ) que aquelas dos grupos CO e BC ( $p < 0,05$  para palmitato de retinila no grupo BC aos 11° e 16° dias), conforme Tabela 1. Estes valores estão representados graficamente nas Figuras 5 e 6. Além disso, os conteúdos hepáticos de retinol e de palmitato de retinila, no grupo BC, foram significativamente maiores que aqueles do grupo controle ( $p < 0,05$  para os tempos zero e 7° dia, e  $p < 0,01$  para 11° e 16° dias).

Não foi constatada nenhuma diferença significativa nas concentrações hepáticas de  $\beta$ -caroteno, retinol ou palmitato de retinila, entre os diferentes momentos do sacrifício em um mesmo grupo experimental, ou seja, o tempo de sacrifício (dias após HP) não afetou o acúmulo destas substâncias no fígado dos animais.

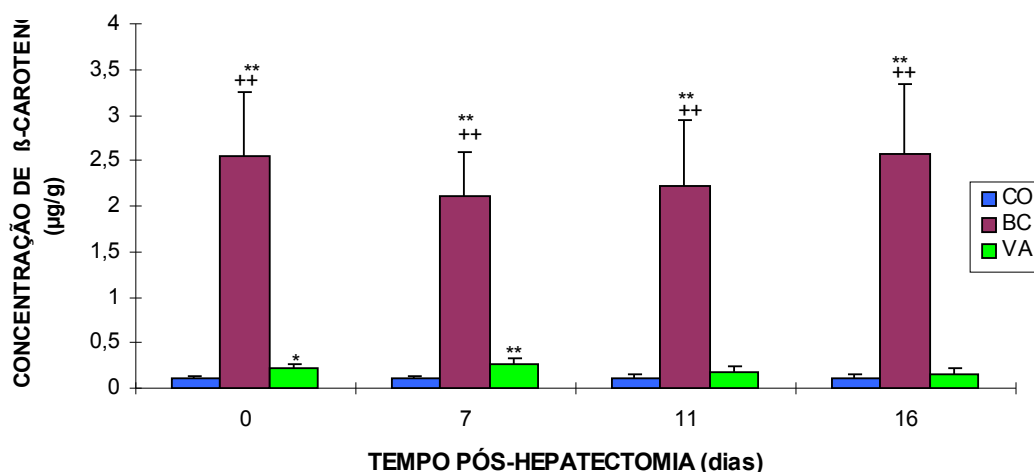
**TABELA 1.** Concentração de  $\beta$ -caroteno, retinol e palmitato de retinila ( $\mu\text{g/g}$  de tecido)<sup>♦</sup>, por tratamento e tempo de sacrifício (dias após hepatectomia parcial), no fígado de ratos Wistar tratados por via intragástrica e em dias alternados, com óleo de milho - controle (CO),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA) e submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular

TEMPO DE SACRIFÍCIO	GRUPO/TRATAMENTO		
	CO	BC	VA
<b><math>\beta</math>-Caroteno</b>			
Zero	0,10 $\pm$ 0,03	2,54 $\pm$ 0,72** ††	0,21 $\pm$ 0,06*
7° dia	0,11 $\pm$ 0,03	2,12 $\pm$ 0,48** ††	0,27 $\pm$ 0,07**
11° dia	0,12 $\pm$ 0,03	2,23 $\pm$ 0,71** ††	0,18 $\pm$ 0,06
16° dia	0,11 $\pm$ 0,04	2,58 $\pm$ 0,76** ††	0,16 $\pm$ 0,05
<b>Retinol</b>			
Zero	9,90 $\pm$ 3,74	21,09 $\pm$ 6,34* ††	72,20 $\pm$ 24,04**
7° dia	9,34 $\pm$ 5,50	20,32 $\pm$ 6,01* ††	79,00 $\pm$ 29,30**
11° dia	8,93 $\pm$ 1,68	26,28 $\pm$ 4,82** ††	70,07 $\pm$ 19,36**
16° dia	12,50 $\pm$ 3,70	21,89 $\pm$ 3,52** ††	71,80 $\pm$ 21,82**
<b>Palmitato de Retinila</b>			
Zero	12,81 $\pm$ 6,15	32,06 $\pm$ 12,39* ††	138,17 $\pm$ 31,54**
7° dia	16,13 $\pm$ 4,93	28,62 $\pm$ 8,62* ††	114,57 $\pm$ 30,84**
11° dia	11,19 $\pm$ 4,03	37,44 $\pm$ 8,16** †	110,01 $\pm$ 49,55**
16° dia	14,19 $\pm$ 3,77	24,80 $\pm$ 4,13** †	117,01 $\pm$ 58,14**

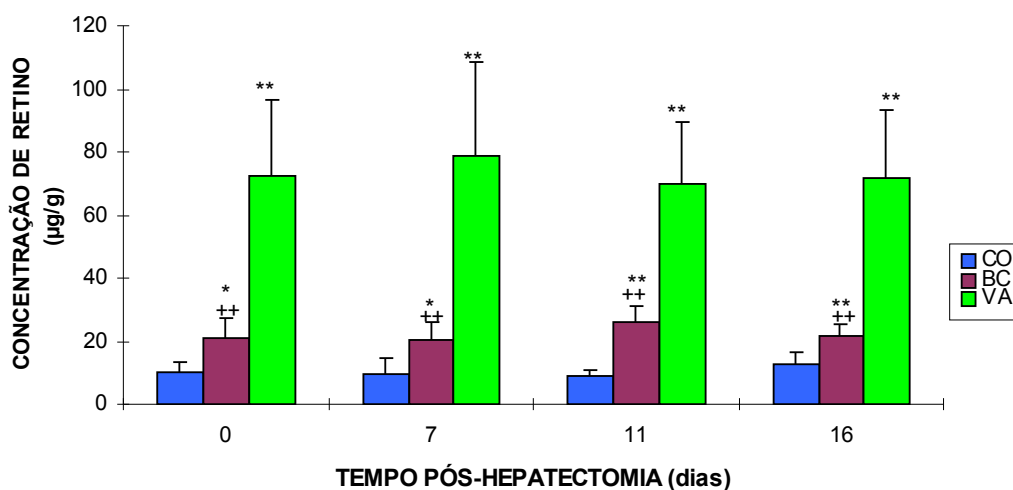
<sup>♦</sup> Valores são médias  $\pm$  D.P. para quatro animais.

Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (CO), pelo Teste *t* de Student – \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo vitamina A (VA), pelo Teste *t* de Student – † =  $p < 0,05$ ; †† =  $p < 0,01$ .

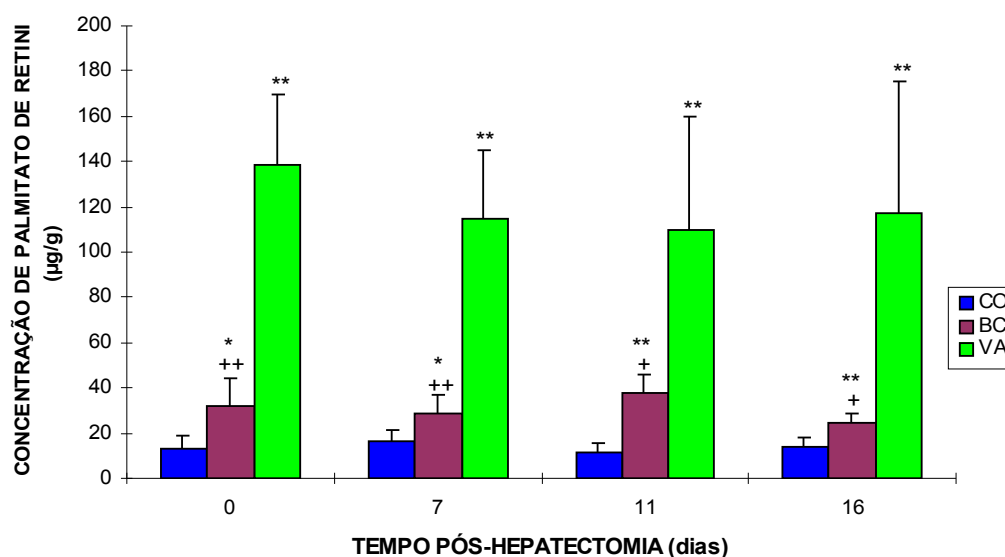


**FIGURA 4.** Concentração de β-caroteno em fígado de ratos Wistar (média ± D.P. para quatro animais) tratados com óleo de milho (CO), β-caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial. Os símbolos localizados acima das barras de D.P. indicam concentrações de β-caroteno estatisticamente diferentes em relação ao grupo CO (\*) e VA (+) (Teste t de *Student*, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* e ++ =  $p < 0,01$ ).



**FIGURA 5.** Concentração de retinol em fígado de ratos Wistar (média ± D.P. para quatro animais) tratados com óleo de milho (CO), β-caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial. Os símbolos localizados acima das barras de D.P. indicam concentrações de retinol estatisticamente diferentes em relação ao grupo CO (\*) e VA (+) (Teste t de *Student*, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* e ++ =  $p < 0,01$ ).





**FIGURA 6.** Concentração de palmitato de retinila em fígado de ratos Wistar (média  $\pm$  D.P. para quatro animais) tratados com óleo de milho (CO),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação celular, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial. Os símbolos localizados acima das barras de D.P. indicam concentrações de palmitato de retinila estatisticamente diferentes em relação ao grupo CO (\*) e VA (+) (Teste t de Student, \* e + =  $p < 0,05$ ; \*\* e ++ =  $p < 0,01$ ).

### 4.3. CINÉTICA DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS OVAIS

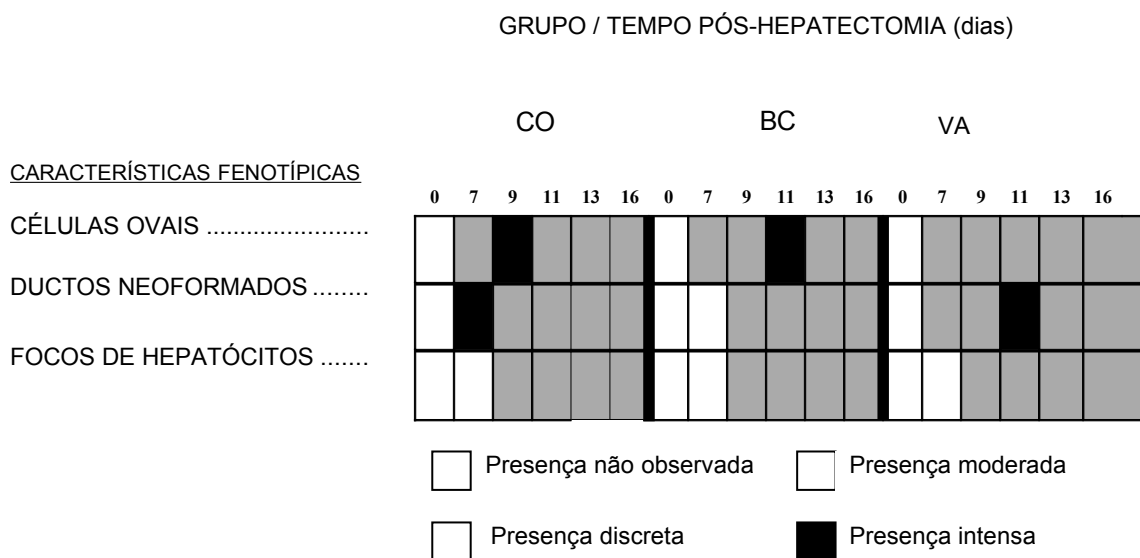
A cinética da proliferação de células ovas foi analisada através de técnicas histológica (HE) e imuno-histoquímica (GST-P), em amostras de fígado de animais (submetidos ao modelo AAF/PH adaptado para ratos Wistar) sacrificados nos tempos zero, 7°, 9°, 11°, 13° e 16° dias pós-hepatectomia (4 ratos/tempo de sacrifício/tratamento).

#### 4.3.1. Avaliação Histológica (HE)

Observou-se a seguinte cinética da proliferação de células ovas nos fígados dos ratos Wistar tratados com óleo de milho (grupo controle), conforme representado esquematicamente na Figura 7 (elaborada segundo estimativa de um patologista): presença moderada de células ovas no 7° dia pós-hepatectomia nas regiões periportais, que aumentou significativamente ao 9° dia, proliferando em direção à zona 3 do ácino hepático; redução significativa da celularidade periportal ao 11° dia, que manteve-se neste nível no 13° e 16° dias pós-hepatectomia. No caso dos animais tratados com  $\beta$ -

caroteno (grupo BC), constatou-se um retardo no pico de proliferação das células ovais, observado aos 11° dia após HP, da mesma forma que para o grupo VA, que também apresentou proliferação acentuada em dias mais tardios em relação à HP (11° e 13° dias).

Além das células ovais, foram observadas outras características fenotípicas, tais como a formação de estruturas tipo ductos biliares por todo o parênquima hepático. Também neste caso, o grupo CO apresentou uma presença intensa de ductos neoformados precocemente (no 7° dia pós-hepatectomia), em relação aos demais grupos, e no grupo VA observou-se maior presença de ductos neoformados em relação aos grupos CO e BC, a partir do 11° dia pós-hepatectomia. Por outro lado, constatou-se com maior frequência, a presença de focos de hepatócitos no grupo CO a partir do 11° dia pós-hepatectomia, em relação aos demais grupos. A presença de focos de hepatócitos foi observada, em todos os grupos experimentais, a partir dos 9° dia após HP (Fig. 7). Em anexo encontra-se a Figura 8, constituída por foto-micrografias que ilustram as características fenotípicas observadas por HE.



**FIGURA 7.** Representação esquemática dos resultados da análise histoquímica (HE) em fígado de ratos tratados com óleo de milho (CO),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial. Os dados são representativos de quatro animais.

#### 4.3.2. Avaliação Imuno-Histoquímica (GST-P)

De uma forma geral, a cinética da proliferação de células ovais, observada por HE, foi confirmada através da quantificação do número de células ovais positivas para GST-P. Na Tabela 2, onde estão apresentados os resultados desta avaliação, observa-se que a porcentagem de área periportal ocupada pelas células ovais no tempo zero (à hepatectomia), é bastante reduzida (cerca de 3%), e semelhante entre os três grupos experimentais. Aos 7º dia pós-hepatectomia esta medida aumentou consideravelmente no grupo controle ( $12,67 \pm 4,73$  %), sendo maior que aquelas dos grupos-teste ( $7,67 \pm 2,08$  % para o grupo BC e  $8,33 \pm 2,31$  % para o grupo VA), embora não sejam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). Porém, aos 9º dia pós-hepatectomia, o grupo CO apresentou uma proliferação significativamente maior de células ovais ( $p < 0,01$ ) em relação aos grupos BC e VA ( $26,67 \pm 1,53$  %,  $18,67 \pm 0,58$  % e  $16,25 \pm 3,30$  %, respectivamente). Nos 11º dia pós-hepatectomia a área ocupada pelas células ovais reduziu no grupo CO ( $15,33 \pm 4,73$  %), mantendo-se em proporções semelhantes nos dias subsequentes (13º e 16º). Ao contrário, constatou-se uma presença intensa de células ovais entre os dias 11º e 13º após HP, de forma semelhante nos grupos BC e VA, e significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que o grupo CO no 13º dia pós-hepatectomia ( $23,00 \pm 3,00$  %,  $22,67 \pm 4,93$  %,  $14,00 \pm 2,94$  %, respectivamente). Nos 16º dia pós-HP, observou-se um maior número de células ovais nas regiões periportais nos grupos CO e VA em relação ao grupo BC:  $15,25 \pm 3,86$  %;  $14,25 \pm 3,30$  % e  $10,00 \pm 2,45$  %, respectivamente (diferenças não significativas para  $p \leq 0,05$ ).

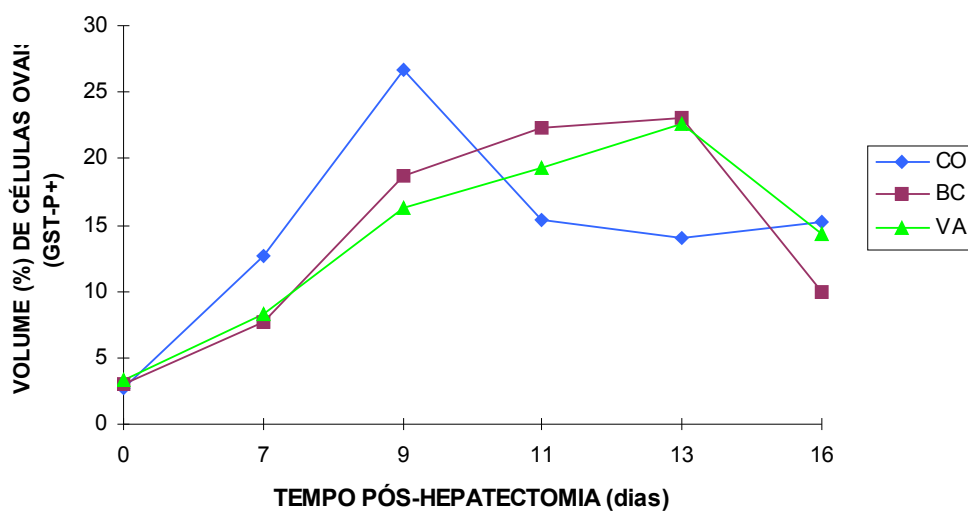
A cinética da proliferação de células ovais, evidenciada por marcação imuno-histoquímica com GST-P, encontra-se representada graficamente na Figura 9, e ilustrada por meio de fotomicrografias apresentadas em anexo, nas figuras 10,11 e 12.

**TABELA 2.** Volume (%)<sup>♦</sup> de área ocupada por células ovais positivas para GST-P, na zona periportal de fígado de ratos tratados com óleo de milho - controle (CO),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial

GRUPO	TEMPO DE SACRIFÍCIO					
	ZERO	7 <sup>o</sup>	9 <sup>o</sup>	11 <sup>o</sup>	13 <sup>o</sup>	16 <sup>o</sup>
CO	2,75 $\pm$ 0,96	12,67 $\pm$ 4,73	26,67 $\pm$ 1,53	15,33 $\pm$ 4,73	14,00 $\pm$ 2,94	15,25 $\pm$ 3,86
BC	3,00 $\pm$ 0,71	7,67 $\pm$ 2,08	18,67 $\pm$ 0,58**	22,33 $\pm$ 2,52	23,00 $\pm$ 3,00*	10,00 $\pm$ 2,45
VA	3,25 $\pm$ 1,89	8,33 $\pm$ 2,31	16,25 $\pm$ 3,30**	19,25 $\pm$ 4,11	22,6 $\pm$ 4,93*	14,25 $\pm$ 3,30

<sup>♦</sup>Valores são médias  $\pm$  D.P. para três ou quatro ( no caso dos sub-grupos CO-13<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> dias, BC-16<sup>o</sup> dia e VA-9<sup>o</sup>,11<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> dias pós-HP) animais - análise de 15 regiões periportais do lobo anterior direito, em cortes de fígado.

Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (CO), pelo Teste *t* de Student - \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .



**FIGURA 9.** Volume (%) de área ocupada por células ovais (GST-P +), em regiões periportais de fígado de ratos Wistar (média para três ou quatro animais) tratados com óleo de milho (CO),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial.

#### 4.4. EXPRESSÕES DOS GENES QUE CODIFICAM PARA AS CONEXINAS 43 E 32

A evolução das expressões dos genes que codificam para as conexinas 43 e 32, nos diferentes dias pós-hepatectomia e tratamentos considerados no protocolo experimental, está ilustrada nas cópias das autoradiografias apresentadas na Figura 13, que contém também os resultados das hibridizações com o gene controle ( $\beta$ -actina). Estas autoradiografias ilustram o resultado de três experimentos – RNA de fígados de 3 ratos / tempo de sacrifício / tratamento, totalizando 117 amostras. Observa-se, no grupo controle (CO), que a expressão gênica para a cx 43 (de células ovas), foi maior nos primeiros dias após a hepatectomia (entre o 3º e 8º dias), e no caso dos grupos-teste, nos dias mais tardios – BC, entre os dias 8 e 12, e VA, entre o 10º e 15º dias pós-hepatectomia.

Na Figura 14 encontram-se os resultados da análise de imagem das autoradiografias correspondentes às hibridizações com o cDNA do gene para cx 43, corrigidos pela quantidade de amostra hibridizada (ajuste por comparação com a expressão do gene controle), e relativos ao tempo zero. Observam-se, em todos os grupos experimentais, dois picos de expressão gênica para a cx 43, sendo que o maior pico de expressão, no grupo CO, ocorreu no 7º dia pós-hepatectomia, e que nos grupos-teste, este momento é deslocado para dias mais tardios – para o 11º dia no grupo BC, e para o 12º dia no grupo VA. O grupo VA apresentou maiores níveis de expressão gênica para cx 43, em relação ao tempo zero (4,4 vezes maior ao 11º dia), sendo a expressão máxima para o grupo BC de 2,5 vezes (ao 12º dia) e para o grupo CO de 3,5 vezes (ao 7º dia). Além disso, constataram-se níveis de expressão maiores que aquele do ponto inicial (tempo zero) por mais tempo no grupo VA, em relação aos demais grupos, a partir do 10º dia, permanecendo acima do ponto inicial em todos os dias subsequentes. No caso dos grupos BC e CO, ao 16º dia pós-hepatectomia foi observado menor expressão em relação ao tempo zero (Figura 14).

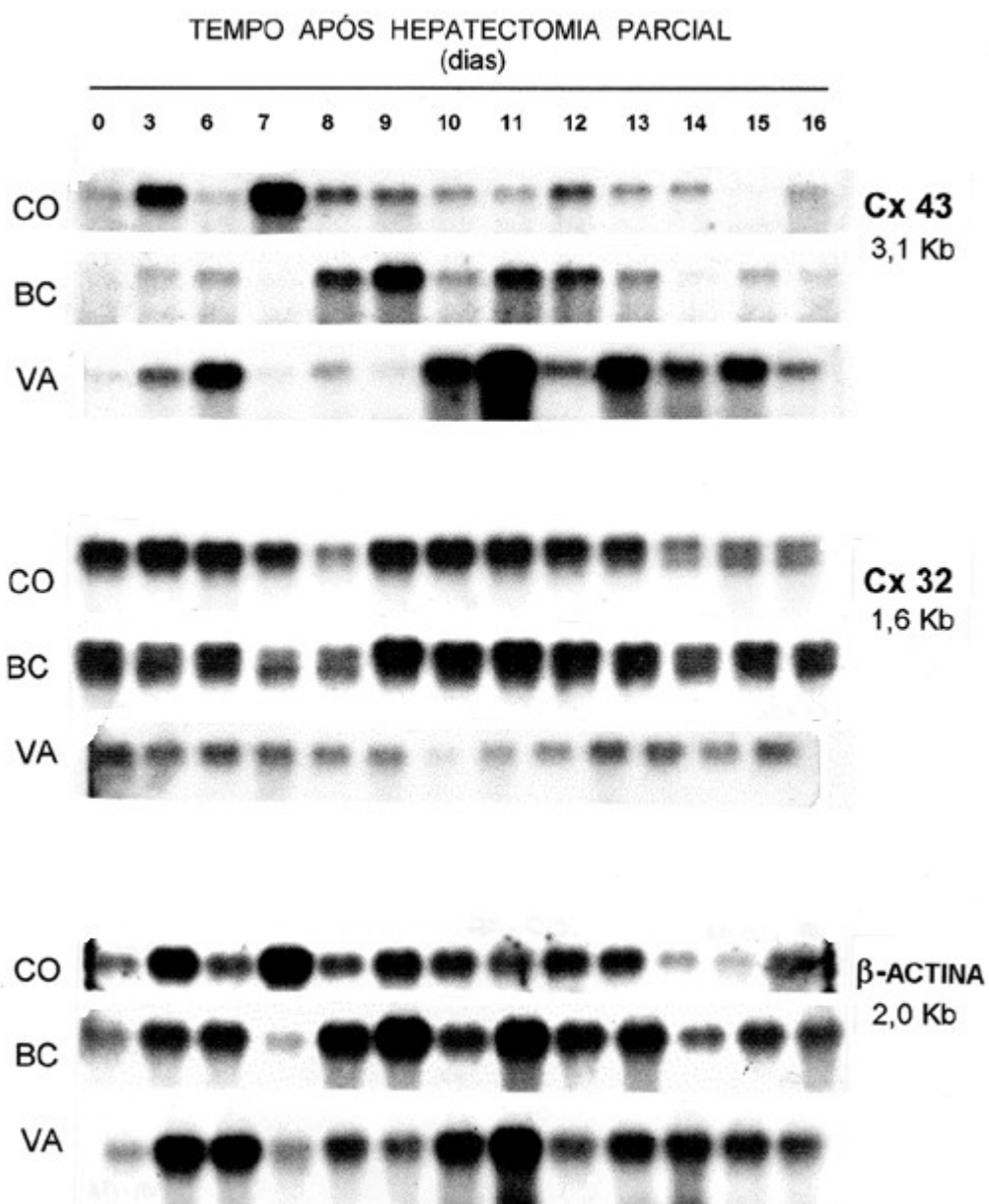
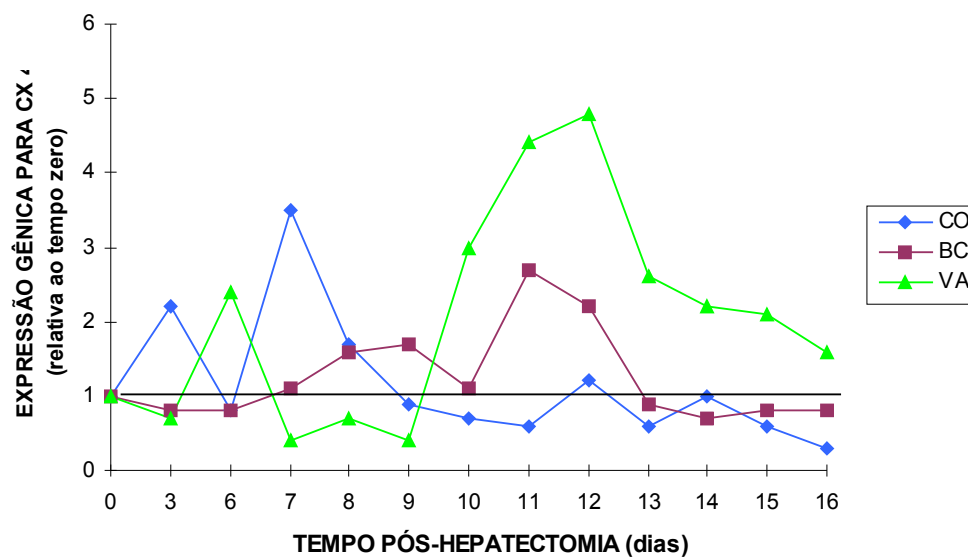


Figura 13. Expressões dos genes que codificam para as conexinas 43 (Cx 43) e 32 (Cx 32) em fígado de ratos Wistar tratados com óleo de milho – grupo controle (CO),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais e sacrificados em diferentes dias pós-hepatectomia. Cada auto-radiografia ilustra os resultados de três experimentos.  $\beta$ -Actina foi usada como um controle



**FIGURA 14.** Expressão do gene que codifica para a cx 43 (relativa ao tempo zero) em fígado de ratos Wistar tratados com óleo de milho (CO),  $\beta$ -caroteno (BC) ou vitamina A (VA), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial.

Por outro lado, a expressão gênica para cx 32 (de hepatócitos) foi relativamente constante durante todo o período pós-hepatectomia considerado, em todos os grupos experimentais (Figura 13).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. MODELO AAF/PH ADAPTADO PARA RATOS WISTAR

O modelo AAF/PH de diferenciação celular hepática, descrito pelo grupo de Thorgeirsson (Evarts *et al.*,1987, Evarts *et al.*,1989, Evarts *et al.*, 1990), compreende o uso de ratos machos, da linhagem F-344 (isogênicos), pesando entre 150 a 180 g ao início da administração do AAF, cuja dose total é de 9 mg/rato (9 x 1 mg/rato). Neste modelo, que constitui uma versão não-iniciada (com carcinogênico) do modelo do hepatócito resistente de carcinogênese (Solt & Farber,1976), ocorre uma reposição da massa celular hepática, segundo Evarts *et al.* (1987 e 1989), a partir da ativação, proliferação e diferenciação de células ovais (possíveis descendentes das *stem cells* existentes no fígado do animal adulto), as quais dão origem aos hepatócitos, de forma semelhante ao processo de desenvolvimento que acontece durante a vida fetal. O modelo AAF/PH é, portanto, de grande utilidade para o estudo dos mecanismos envolvidos na diferenciação celular hepática no animal adulto, através sobretudo da análise da expressão de genes nas células progenitoras e respectivas progênes, e dos meios pelos quais se poderia, eventualmente, modular este processo.

Por outro lado, o protocolo experimental do presente estudo envolveu o uso de ratos machos da linhagem Wistar e a administração de 24 mg de AAF/rato (6 x 20 mg/kg de peso corpóreo, considerando-se o peso médio no período de aplicação do modelo de 200 g). A referida dose de AAF, bem superior àquela utilizada no modelo AAF/PH em ratos F-344, é a mesma empregada usualmente no modelo RH de hepatocarcinogênese adaptado para ratos Wistar (Moreno *et al.*,1991,Moreno *et al.*,1995a,Rizzi *et al.*,1997) e foi previamente testada em ratos Wistar submetidos ao modelo AAF/PH, através de um estudo-piloto.

Sabe-se que variáveis tais como o sexo, idade e linhagem dos animais são fundamentais na determinação de respostas biológicas em modelos experimentais. Nesse sentido, ratos machos, jovens, e da linhagem F-344 são mais sensíveis à ação de carcinógenos em modelos de hepatocarcinogênese, em relação a ratos fêmeas e com mais idade (Dragan *et al.*,1997) ou da linhagem Wistar (Irving,1975). Portanto, em nosso experimento foram utilizados animais potencialmente mais resistentes à ação do AAF (ratos



Wistar, com cerca de 200 g por ocasião da aplicação do modelo) em relação àqueles usados originalmente no modelo AAF/PH (ratos F-344, pesando entre 150 e 180 g). Em contrapartida, administrou-se uma dose de AAF de 2,5 vezes maior, com o objetivo de produzir respostas biológicas similares àquelas observadas em ratos F-344.

Segundo os resultados das análises histológicas (HE) e imuno-histoquímicas (GST-P), observou-se uma presença marcante de células ovais que invadiram o ácino hepático a partir da região periportal, e uma redução gradativa da área ocupada por essas células à medida que a massa celular hepática foi sendo reposta, conforme descrito na literatura (Evarts *et al.*,1987, Evarts *et al.*,1989, Evarts *et al.*,1990). Além disso, relata-se que no modelo AAF/PH ocorre a formação de uma rede de ductos jovens que se difundem por todo o ácino hepático (Evarts *et al.*,1987), bem como a presença esporádica de lesões pré-neoplásicas (Evarts *et al.*,1989), estruturas também observadas em nosso experimento (Figuras 7 e 8).

Vale acrescentar que nos trabalhos originais realizados pelo grupo de Thorgeirsson (Evarts *et al.*,1987, Evarts *et al.*,1989) estudou-se o processo de diferenciação de células ovais a partir dos dias zero, 3, 7, 9, 11 e 13 pós-hepatectomia. No presente estudo, decidiu-se aumentar o número de pontos de observação, ou seja, treze momentos diferentes distribuídos entre o zero e 16º dia pós-hepatectomia (Figura 1), para ser possível visualizar o processo de proliferação das células ovais com mais detalhes, e conseqüentemente identificar eventuais diferenças entre os grupos experimentais – BC em relação aos grupos CO (controle negativo) e VA (controle positivo).

## **5.2. NÍVEIS HEPÁTICOS DE BETA-CAROTENO E VITAMINA A**

Vários relatos têm evidenciado que o  $\beta$ -caroteno, quando administrado em doses farmacológicas crônicas (suplementado na ração ou por via intragástrica) é absorvido intacto e acumula-se em diferentes órgãos de roedores, especialmente no fígado (Shapiro *et al.*,1984, Bianchi-Santamaria *et al.*,1994, Jones *et al.*,1994). No presente estudo, as doses farmacológicas de  $\beta$ -caroteno (70 mg/kg de peso corpóreo) e de vitamina A (10 mg/kg de peso corpóreo), administradas via intragástrica em dias alternados durante cerca de cinco semanas consecutivas, foram definidas para ratos Wistar em

trabalhos prévios do grupo de Moreno (Moreno *et al.*,1991, Moreno *et al.*, 1995a).

Conforme os resultados apresentados na Tabela 1, o tratamento com  $\beta$ -caroteno aumentou significativamente ( $p < 0,01$ ) a concentração hepática do carotenóide, bem como elevou cerca de duas vezes os níveis de vitamina A (tanto o retinol quanto o palmitato de retinila), em relação àqueles do grupo CO, confirmando a conversão metabólica do  $\beta$ -caroteno a retinóides. A grande quantidade disponível do carotenóide foi suficiente não apenas para gerar um acúmulo significativo do mesmo no fígado, mas também para dobrar as reservas hepáticas de vitamina A (na forma de palmitato de retinila), fato já evidenciado em outros estudos (Jones *et al.*,1994, Rizzi *et al.*,1997). O aumento significativo do retinol hepático ( $p < 0,05$  para os tempos zero e 7º dia, e  $p < 0,01$  para os 11º e 16º dias), também foi relatado na literatura, quando roedores foram tratados com doses farmacológicas crônicas de  $\beta$ -caroteno (Astorg *et al.*,1996, Iyama *et al.*,1996). Em conjunto, estes dados indicam um potencial de ação do carotenóide tanto na sua forma intrínseca, quanto na forma de retinóides, particularmente como ácido retinóico (via metabolismo oxidativo do retinol), o qual tem sido apontado como o retinóide responsável pela maioria das funções exercidas pela vitamina A, como por exemplo, sua função na diferenciação celular (Lotan,1996, Silveira & Moreno, 1998).

Conforme o esperado, o tratamento com vitamina A (acetato de retinila) resultou em concentrações hepáticas bem mais elevadas de retinol e palmitato de retinila, em relação aos grupos CO e BC (valores estatisticamente diferentes). Uma observação interessante é que o conteúdo hepático de  $\beta$ -caroteno nos animais que receberam vitamina A foi maior que aqueles do grupo CO (diferença significativa para os tempos zero e 7º dia, conforme Tabela 1). Este fato ocorreu provavelmente porque o organismo dos ratos estava saturado em vitamina A e demais retinóides, o que evitou a conversão metabólica do  $\beta$ -caroteno contido na ração comercial ingerida por esses ratos, com conseqüente acúmulo do carotenóide intacto no fígado dos animais. Da mesma forma, em trabalho prévio do grupo de Moreno (Rizzi *et al.*, 1997), constatou-se um aumento na concentração hepática de  $\beta$ -caroteno (diferença não significativa para  $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle, em

ratos Wistar tratados com vitamina A por cinco semanas consecutivas durante a etapa de promoção precoce de modelo de hepatocarcinogênese.

Por fim, o tempo de tratamento anterior à hepatectomia (aproximadamente cinco semanas consecutivas) parece ter sido suficiente para saturar os tecidos com  $\beta$ -caroteno ou vitamina A, uma vez que não foi constatada uma relação direta entre tempo de sacrifício (dias após hepatectomia) e níveis hepáticos de  $\beta$ -caroteno, retinol ou palmitato de retinila.

### 5.3. PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS OVAIS

A diferenciação celular hepática, induzida no modelo AAF/PH para reposição do parênquima hepático no animal adulto, é caracterizada pela ativação de células progenitoras (células ovas), possivelmente originárias do epitélio ductular, e também denominadas células ductulares, que proliferam a partir da região periportal ou zona 1 do ácino hepático. Relata-se que as primeiras células a apresentar síntese de DNA (identificada por autoradiografia usando-se timidina tritiada) após hepatectomia parcial, no modelo AAF/PH, são as células ovas (caracterizadas por imuno-histoquímica usando-se anticorpos contra o antígeno OV-6), e as células de Ito (células estelares perisinusoidais), que expressam fatores de crescimento envolvidos com a regeneração do fígado e estocam vitamina A (Evarts *et al.*, 1993, Hu *et al.*, 1993).

Discute-se que o compartimento das células ovas é bastante heterogêneo, contendo células imaturas em vários estágios de diferenciação e com potencial para se diferenciar em pelo menos duas linhagens diferentes de células – a linhagem hepatocitária e a linhagem ductular. Segundo Hixon *et al.* (1990), a população de células ovas constitui um compartimento celular fenotipicamente complexo, composto de pelo menos três subpopulações antigênicas distintas que se assemelham a: (1) hepatoblastos fetais, provavelmente bipotentes que expressam poucos antígenos ductulares e hepatocitários; (2) células fetais de “transição” com propriedades morfológicas e antigênicas próprias tanto de células fetais quanto de hepatócitos adultos, e (3) células ductulares primitivas. Em modelo de hepatocarcinogênese, Tee *et al.* (1996) constataram a existência de duas populações de células ovas –

uma população maior que expressava apenas marcadores de hepatócito fetal, e uma população menor expressando marcadores de hepatócito fetal, de hepatócito adulto e de célula do epitélio biliar. Além disso, através de autoradiografia usando timidina tritiada, estes autores mostraram que células ovais e células tipo ductulares se diferenciaram em hepatócitos.

Verifica-se no modelo AAF/PH que as células ovais, as quais aparecem inicialmente nas áreas periportais, dão origem a estruturas tipo ductos que se disseminam por todo o parênquima hepático. Sendo assim, discute-se que durante o processo de restauração do órgão, a nova população de hepatócitos originar-se-ia tanto das células ovais (Evarts *et al.*, 1987) quanto das células epiteliais dos pequenos ductos neoformados (Golding *et al.*, 1995, Tee *et al.*, 1996), que por sua vez constituiriam progênies daquelas (Tee *et al.*, 1994). De acordo com os resultados de Tee *et al.* (1996), as células ovais e as do tipo ductulares têm características similares aos hepatoblastos (presentes no feto durante o desenvolvimento do fígado), isto é, expressam marcadores tanto de hepatócitos quanto de células epiteliais biliares e têm a capacidade de se diferenciar em hepatócitos.

Antígenos associados às células ovais tais como OC.2, OC.3 e OV-6, são expressados também pelas células ductulares no rato adulto (Hixon *et al.*, 1990). Além dos anticorpos contra esses antígenos, anticorpos anti-citoqueratinas (anti-ck 19, AE1/AE3) são também utilizados para marcar as células ovais (Tee *et al.*, 1996, Fiorio, 1998). Por outro lado, a GST-P, um marcador de fígado fetal e de lesões hepáticas pré-neoplásicas, está presente também nas células ovais (Evarts *et al.*, 1990, Faris *et al.*, 1991). Por conseguinte, têm-se caracterizado as células ovais através de marcação imuno-histoquímica com anticorpos anti-GST-P (Imai *et al.*, 1996, Dagli *et al.*, 1998).

A cinética da proliferação de células ovais constatada em ratos Wistar, no presente trabalho, para o grupo controle (CO), foi similar àquela relatada por Evarts *et al.* (1987) quando observaram *in vivo* (em ratos F-344), a transferência de marcação com timidina tritiada, das células ovais para pequenos hepatócitos, ou seja, intensa proliferação de células ovais entre o 7º e 11º dias pós-hepatectomia, com redução da área ocupada por essas células nos dias subseqüentes (Figuras 7, 10, 11 e 12 [13d e 16d]).

Os focos de hepatócitos presentes com considerável freqüência (presença moderada, Figura 7) nos dias mais tardios pós-hepatectomia, podem ser considerados não apenas lesões “espontâneas”, mas uma consequência da dose de AAF (24 mg/rato), bem maior que a usada para ratos F-344, embora o rato Wistar seja mais resistente à ação de carcinógenos, como mencionado anteriormente. Quando Evarts *et al.* (1989) aumentaram a dose de AAF para 21 mg/rato, em ratos F-344 submetidos ao modelo AAF/PH, constataram a presença de metaplasia intestinal, bem como um maior número de hepatócitos atípicos, em relação aos animais que receberam a dose convencional de AAF (9 mg).

O acúmulo de  $\beta$ -caroteno ou vitamina A no fígado dos animais do grupo BC e VA, retardou, de maneira semelhante entre os dois grupos, a proliferação de células ovais (Tabela 2 e Figura 9) e possivelmente, a diferenciação celular hepática. De fato, verificou-se a presença mais evidente de ductos neoformados entre os dias 11<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> nos grupo BC e VA, enquanto que no grupo CO isto ocorreu entre os dias 7 e 9 pós-hepatectomia (Figura 7).

Aos 16<sup>o</sup> dia após HP observou-se uma menor celularidade nas regiões periportais no grupo BC, em relação aos demais grupos experimentais (diferenças não significativas para  $p \leq 0,05$ ), confirmando resultado prévio obtido pelo grupo de Moreno, ao utilizar a GST-P como marcador de células ovais, em ratos Wistar submetidos ao modelo do hepatócito resistente (Dagli *et al.*, 1998). Verificou-se, ainda, no referido tempo, uma presença considerável de células ovais, em todos os grupos experimentais, em relação ao ponto inicial (tempo zero) (Tabela 2), indicando que o processo de diferenciação das células ovais ainda não havia se completado.

Os resultados obtidos mediante exames histológicos e imuno-histoquímicos revelam uma ação do  $\beta$ -caroteno sobre a proliferação de células ovais, similar àquela observada nos animais tratados com vitamina A, uma vez que nos dois grupos o pico de proliferação das células ovais foi deslocado para dias mais tardios após HP. Entretanto, foi observada uma tendência no grupo BC em apresentar menor quantidade de ductos neoformados (Figura 7) e de células ovais (aos 16<sup>o</sup> dia pós-HP) (Tabela 2), em relação aos demais grupos experimentais, fatos que sugerem uma ação intrínseca do  $\beta$ -caroteno no sentido de induzir a diferenciação das células

ovais em hepatócitos. Além disso, evidenciou-se uma presença menor de focos de hepatócitos no fígado dos animais tratados com o carotenóide (Figura 7), em relação ao grupo CO e VA, achado consistente com os relatos do grupo de Moreno (Moreno *et al.*,1991, Moreno *et al.*,1995a, Rizzi *et al.*, 1997, Dagli *et al.*,1998, Fiorio,1998). Considerados em conjunto, estes dados indicam que a indução da diferenciação das células ovas poderia, eventualmente, ser um dos mecanismos de ação quimiopreventiva do  $\beta$ -caroteno sobre o processo de hepatocarcinogênese experimental.

Para elucidar uma possível ação intrínseca do carotenóide sobre as células ovas no modelo AAF/PH aplicado em ratos Wistar, sugere-se o uso de doses relativamente menores de AAF (por exemplo, 18 mg, distribuídos em 9 doses de 2 mg cada), no sentido de evitar possíveis interferências da droga no processo de diferenciação das células ovas. Além disso, propõe-se a introdução de tempos de sacrifício após o 16º dia (por exemplo, 20º, 24º, e 28º dias pós-hepatectomia), para verificar se persiste uma população residual de células ovas após a completa regeneração do parênquima hepático, bem como esclarecer se o  $\beta$ -caroteno reduz, de forma significativa e mais precocemente este contingente celular, em relação aos grupos VA (controle positivo) e CO (controle negativo).

#### **5.4. EXPRESSÃO GÊNICA PARA CONEXINAS NO FÍGADO**

O estudo da expressão de conexinas durante o processo de carcinogênese justifica-se em função do papel das GJIC no controle da diferenciação e proliferação celulares, uma vez que o câncer caracteriza-se pela produção de clones de células não-diferenciadas terminalmente ou “desdiferenciadas” que mantêm a imortalidade e a capacidade de responder a estímulo proliferativo (Trosco *et al.*,1990, Yamasaki *et al.*,1995, Scott, 1997, Hixon *et al.*,1997).

A expressão de conexinas é tecido-específica, o que sugere uma relação entre os genes que codificam para essas proteínas e o programa de diferenciação celular nos diferentes tecidos. No fígado de roedores, as únicas proteínas das junções tipo hiato identificadas são as conexinas 32 e 26, presentes nas GJIC dos hepatócitos, e somente quantidades-traço de mRNA de cx 43 são detectadas nesse órgão, em condições normais. No entanto,

Stutenkemper *et al.* (1992) constataram, *in vitro*, níveis de expressão gênica para cx 43 relativamente altos, e ao contrário, baixos níveis de expressão de cx 32 e cx 26, em linhagens de células hepáticas que se tornaram “desdiferenciadas” (que perderam o fenótipo característico de hepatócitos). Da mesma forma, durante a regeneração do fígado *in vivo*, quando células ovais (não-diferenciadas) são recrutadas, detectam-se altos níveis de expressão de cx 43 (Zhang & Thorgeirsson, 1994, Neveu *et al.*, 1995). Esta proteína estrutural de GJIC é expressa também em outras células hepáticas não-parenquimatosas, como células do epitélio ductular, células endoteliais e células de Ito (Neveu *et al.*, 1994, Neveu *et al.*, 1995).

De uma forma geral, observou-se, no presente experimento, uma tendência similar entre a expressão gênica para cx 43 (Figura 14) e a cinética da proliferação de células ovais (Figura 9), onde os valores mais elevados das referidas curvas, no grupo CO, tenderam a ficar mais a esquerda dos gráficos (entre os 7º e 9º dias pós-hepatectomia). Nos grupos BC e VA, os mais altos níveis de expressão gênica e maior população de células ovais foram detectados em tempos mais tardios (entre os 11º e 13º dias após HP). Os achados relativos aos grupos-teste (BC e VA) são consistentes com os relatos de Zhang & Thorgeirsson (1994) e Neveu *et al.* (1995), que investigaram a expressão gênica para conexinas em ratos F-344 submetidos ao modelo AAF/PH – os primeiros autores constataram níveis mais elevados de transcritos de cx 43 e maior proliferação de células ovais entre o 8º e 13º dias pós-hepatectomia, e Neveu e colaboradores identificaram níveis aumentados de expressão de cx 43 aos 2º, 4º, 8º e 14º dias após HP, período de proliferação das células ovais. Ressalta-se que, em ratos Wistar, o período (após HP) de maior expressão gênica para cx 43, no grupo controle, ocorreu em dias anteriores àqueles observados para ratos F-344 (Zhang & Thorgeirsson, 1994).

Constataram-se, em todos os grupos experimentais, oscilações nos níveis de expressão da cx 43, tendo sido observado, em todas as curvas, quedas nos níveis de expressão entre os picos, fato também relatado por Neveu *et al.* (1995), e que pode estar associado à proliferação das células ovais e fase S (de síntese de DNA) do ciclo celular, com conseqüente inibição da transcrição gênica.

Os efeitos do  $\beta$ -caroteno sobre a expressão gênica para cx 43 foram qualitativamente similares, e quantitativamente menores, que aqueles da vitamina A. Assim, observou-se uma tendência semelhante entre as curvas de expressão gênica para cx 43 relativas aos grupos BC e VA, onde os picos de expressão estão deslocados para tempos mais tardios após HP (Figura 14), e maiores níveis de expressão no grupo VA em relação aos grupos BC e CO (aumento total da expressão em relação ao tempo zero de 25, 15 e 14 vezes, respectivamente), o que sugere uma ação do carotenóide via retinóides.

Sabe-se que o ácido retinóico pode regular a transcrição gênica ligando-se a receptores nucleares (RAR e RXR), os quais ativam a transcrição interagindo com seqüências específicas de nucleotídeos presentes nos elementos de resposta de seus genes-alvo (Mangelsdorf, 1994). Rogers *et al.* (1990), demonstraram, em células C3H10T1/2, que um análogo sintético do ácido retinóico induziu a formação de GJIC através de um aumento na expressão da cx 43 e do mRNA correspondente. Bex *et al.* (1995), entretanto, constataram em células epiteliais de fígado de rato, que o ácido retinóico foi capaz de melhorar a comunicação intercelular com conexinas somente através da regulação da expressão da cx 43, em nível de proteína (avaliada por *western blot* e imunofluorescência), e não de seu mRNA. Portanto, os retinóides poderiam contribuir com a proliferação e diferenciação das células ovais via indução da expressão da cx 43, tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional, favorecendo a comunicação intercelular homóloga, não apenas entre as próprias células ovais, mas também entre essas e as células de Ito, que acompanham o trajeto das células ovais durante a regeneração hepática, e secretam fatores de crescimento (Evarts *et al.*, 1990, Evarts *et al.*, 1993, Hu *et al.*, 1993).

A expressão gênica para cx 32, por sua vez, permaneceu relativamente constante durante o período de proliferação e diferenciação das células ovais, achado consistente com relatos de literatura (Zhang & Thorgeirsson, 1994, Neveu *et al.*, 1995). Descreve-se ainda que a expressão do gene que codifica para cx 32 oscila, sendo reduzida a níveis abaixo do normal, até o 3º ou 4º dias após a hepatectomia, conforme o ciclo celular (síntese de DNA), na ausência de AAF (efeito antimitótico sobre os hepatócitos), e que se estabiliza nos dias subseqüentes. Estes fatos são



sugestivos da existência de mecanismos pós-transcricionais de controle da expressão da cx 32 durante a regeneração do fígado (Kren *et al.*,1993, Neveu *et al.*,1995). Nesse sentido, Tsuda *et al.* (1995) observaram uma redução na expressão da cx 32 durante a proliferação celular pós-hepatectomia parcial, em fígado de ratos Wistar submetidos a modelo de hepatocarcinogênese isento de AAF.

No presente estudo, a ação modulatória do  $\beta$ -caroteno sobre a expressão gênica para a cx 43 foi confirmada pela cinética da proliferação de células ovais, visto que ambos os fenômenos ocorreram mais tardiamente no processo de diferenciação das referidas células, em relação ao controle. Estes achados são de relevância considerável, uma vez que os relatos disponíveis sobre a expressão gênica para cx 43 no modelo AAF/PH (Zhang & Thorgeirsson,1994, Neveu *et al.*,1995) não incluem o estudo da cinética da proliferação de células ovais, nem da ação do  $\beta$ -caroteno no processo de diferenciação destas células *in vivo*.

Por outro lado, o tratamento com  $\beta$ -caroteno não provocou um aumento na expressão da cx 43. Relata-se, em modelos *in vitro*, que o  $\beta$ -caroteno é capaz de aumentar a expressão da cx 43 através de regulação transcricional e/ou pós-transcricional, de maneira análoga ao ácido retinóico (Zhang *et al.*,1992, Zhang *et al.*,1995, King *et al.*,1997, Stahl & Sies,1998). Contudo, em estudo *in vivo*, não foi evidenciada uma ação indutiva do carotenóide sobre a expressão gênica para cx 43, avaliada através da técnica RT-PCR ou RNA-PCR (reação da polimerase em cadeia), em amostras da mucosa do cólon de indivíduos normais e portadores de lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas, tratados com  $\beta$ -caroteno (30 mg/d) durante três meses (Frommel *et al.*,1994).

Discute-se que o  $\beta$ -caroteno modula a expressão gênica para cx 43 *in vitro* através de uma ação via retinóides, ou de uma ação intrínseca da molécula do carotenóide. Nesse sentido, sugere-se uma ação em nível genômico mediada por receptores da família RXR, com afinidade de ligação tanto para retinóides quanto para carotenóides, ou até mesmo através de uma nova classe de receptores nucleares, embora ainda não tenham sido identificados receptores nucleares específicos para  $\beta$ -caroteno ou outros carotenóides (Zhang *et al.*,1992, Moreno *et al.*,1995a). Em contrapartida, dispõe-se de um corpo de evidências indicando que a ação do  $\beta$ -caroteno,

bem como de outros carotenóides sem atividade pró-vitamínica A, sobre a expressão da cx 43 e GJIC em células C3H10T1/2 é, pelo menos em parte, mediada via retinóides ativos formados por conversão metabólica (enzimática) ou durante a oxidação desses compostos (conversão química) (Acevedo & Bertram,1995, Hanusch *et al.*,1995, Stahl *et al.*,1997, Stahl & Sies,1998). Nesse último caso, demonstrou-se que o ácido 4-oxi-retinóico (produto da oxidação de carotenóides e retinóides) se liga a um receptor nuclear específico do ácido retinóico (RAR $\beta$ ), com alta afinidade, similar a evidenciada para o ácido retinóico *todo-trans* (Pijnappel *et al.*,1993).

Sabe-se que o processo de formação das comunicações intercelulares dependentes de conexinas envolve múltiplos passos e que, portanto, pode ser regulada em diferentes pontos do processo. Evidências sugerem que retinóides e carotenóides induzem a expressão da cx 43 (mRNA ou proteína) *in vitro*, conforme discutido anteriormente. Por outro lado, identificou-se uma inibição na formação de GJIC no fígado de ratos F-344 por ação de agentes promotores de câncer, conseqüente a uma localização anormal de conexinas (intracitoplasmática) e não devido a uma inibição na expressão de conexinas (Krutovskikh *et al.*,1995). Assim, mecanismos pós-traducionais tais como a oligomerização de conexinas, a junção entre conexons, bem como o transporte de aglomerados de conexons até a membrana citoplasmática, podem determinar o nível de comunicação intercelular com conexinas (Bruzzone *et al.*,1996, Yamasaki, 1996).

Neste contexto, faz-se necessário investigar uma eventual ação (pós-transcricional ou pós-traducional) do  $\beta$ -caroteno sobre a formação de GJIC, avaliando em conjunto a expressão do gene para cx 43 (mRNA), a expressão da cx 43 (proteína) e a formação de GJIC.

## **5.5. BETA-CAROTENO, DIFERENCIAÇÃO CELULAR E CARCINOGENESE**

Os poucos relatos disponíveis sobre a ação do  $\beta$ -caroteno na diferenciação celular referem-se a estudos em modelos *in vitro*, em células F9 de carcinoma embrionário (Nikawa *et al.*,1995) e células leucêmicas HL-60 (Biesalski & Schäffer,1997, Gross *et al.*,1997). Tais estudos constataram que o  $\beta$ -caroteno induziu a diferenciação celular, embora em menor intensidade, e mais lentamente (no estudo de Nikawa *et al.*,1995), que o ácido retinóico, mesmo estando o carotenóide presente no meio de cultura em concentração

dez vezes mais elevada que a do retinóide (10  $\mu$ M e 1  $\mu$ M, respectivamente), fatos que sugerem bioconversão do pigmento a retinóides ativos. Entretanto, em dois desses trabalhos os autores sugerem uma ação intrínseca do  $\beta$ -caroteno na indução da diferenciação celular *in vitro* (Biesalski & Schäffer, 1997, Gross *et al.*, 1997).

O  $\beta$ -caroteno pode ser convertido em vitamina A através de clivagem central e/ou excêntrica da molécula por ação da enzima 15,15'-dioxigenase, presente no citossol do enterócito. No caso de clivagem central, a hidrólise se dá na região central da molécula do  $\beta$ -caroteno, produzindo duas moléculas de retinal que podem ser reduzidas a retinol (vitamina A) pela enzima retinal redutase, ou podem ser oxidadas a ácidos retinóicos (Olson, 1989, Wang *et al.*, 1991).

Sabe-se que ácidos retinóicos (*todo-trans* e *9-cis*) ativam a transcrição gênica via receptores nucleares, sendo que o ácido retinóico *todo-trans* possui afinidade de ligação pelo receptor RAR, enquanto que o ácido retinóico *9-cis* exibe afinidade por ambos os receptores RAR e RXR (Mangelsdorf, 1994). Por outro lado, sabe-se que a regulação transcricional em genes eucariotos se dá, em grande parte, pela interação entre receptores nucleares (ou fatores de transcrição) e seqüências específicas de nucleotídeos presentes em regiões promotoras dos genes (Bruzzone *et al.*, 1996). No caso dos receptores RAR e RXR, a interação com os genes-alvo se dá em regiões denominadas RARE (elemento de resposta para o ácido retinóico) ou RXRE (elemento de resposta para o retinóide X) (Mangelsdorf, 1994). A ação de ácidos retinóicos (*todo-trans* e *9-cis*) sobre a diferenciação celular, evidenciada em várias células em cultura (Kurie *et al.*, 1993, Nikawa *et al.*, 1995, Horn *et al.*, 1996), envolve portanto, a ativação de genes que contenham pelo menos um dos elementos de resposta referidos acima.

Muitos pontos necessitam ainda ser esclarecidos sobre a relação entre  $\beta$ -caroteno, diferenciação celular e o processo de carcinogênese. Por exemplo, a caracterização de elementos regulatórios dentro de regiões promotoras de genes de conexinas está apenas começando, sendo que nenhum RARE foi identificado no gene que codifica para a cx 43 (Sullivan *et al.*, 1993).

No presente trabalho, conforme anteriormente mencionado, constatou-se uma tendência similar entre  $\beta$ -caroteno e vitamina A em modular o

processo de proliferação das células ovais e a expressão gênica para cx 43, deslocando ambos os fenômenos para dias mais tardios após HP. No entanto, o tratamento com vitamina A aumentou a expressão da cx 43 (Figura 14), enquanto que a administração de  $\beta$ -caroteno reduziu a população de células ovais aos 16º dia pós-hepatectomia (diferenças não significativas para  $p \leq 0,05$ ) (Figura 9). Estes resultados sugerem, por um lado, uma possível ação do carotenóide na forma de ácido retinóico sobre a expressão gênica da cx 43, e por outro lado, uma eventual ação intrínseca do  $\beta$ -caroteno na indução da diferenciação das células ovais. Ainda, o descompasso entre o número de células ovais (Figura 9) e o nível de expressão da cx 43 (Figura 14) ao 16º dia pós-hepatectomia, constatado sobretudo nos grupos CO e BC, não sustenta a existência de uma relação direta entre a expressão gênica para cx 43 e o processo de diferenciação das células ovais.

Para se chegar a um entendimento mais claro da ação biológica do  $\beta$ -caroteno (e outros carotenóides) sobre a diferenciação celular e carcinogênese, são necessários estudos que relacionem atividade-estrutura química, investigando sua biotransformação (enzimática e química) em tecidos-alvo, particularmente no fígado, em diferentes modelos experimentais *in vivo*. Por fim, o papel do  $\beta$ -caroteno sobre as GJIC, e a relação destas conexões com a diferenciação celular e carcinogênese, necessitam ser investigados em modelos *in vivo*, tais como o modelo AAF/PH usado no presente estudo.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, as seguintes conclusões podem ser estabelecidas:

- A cinética da proliferação de células ovais evidenciada em ratos Wistar do grupo controle, conforme o protocolo experimental utilizado neste estudo, foi similar à descrita para ratos F-344 submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais.
- O acúmulo de  $\beta$ -caroteno no fígado de ratos Wistar, submetidos ao modelo de diferenciação celular, retardou o pico de proliferação das células ovais, de forma semelhante à vitamina A.
- O  $\beta$ -caroteno, presente em quantidades elevadas no fígado de ratos Wistar, submetidos a modelo de diferenciação celular, retardou o pico de expressão do gene que codifica para a conexina 43, de forma similar à vitamina A.
- A administração de vitamina A intensificou a expressão gênica para cx 43, em fígado de ratos Wistar submetidos ao modelo de diferenciação celular.
- O tratamento com  $\beta$ -caroteno não estimulou a expressão do gene que codifica para cx 43, em fígado de ratos Wistar submetidos a modelo de diferenciação celular.
- A administração de  $\beta$ -caroteno ou vitamina A não modulou a expressão do gene que codifica para cx 32, em fígado de ratos Wistar submetidos a modelo de diferenciação celular.
- O  $\beta$ -caroteno modulou a proliferação das células ovais e a expressão gênica para cx 43, em parte via retinóides ativos, no modelo AAF/PH de diferenciação celular hepática.
- O  $\beta$ -caroteno mostrou uma tendência em induzir, de forma intrínseca, a diferenciação das células ovais em hepatócitos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO,P., BERTRAM,J.S. Liarozole potentiates the cancer chemopreventive activity of and the up-regulation of gap junctional communication and connexin 43 expression by retinoic acid and  $\beta$ -carotene in 10T1/2 cells. *Carcinogenesis*, London, v.16,n.9,p.2215 - 2222, 1995.
- ALBANES, D., HEINONEN, O.P., TAYLOR, P.R., HUTTUNEN, J.K.  $\beta$ -Carotene and the risk of lung cancer (correspondence). *J. Natl. Cancer Inst.*, Bethesda, v.89,n.6,p.458,1997.
- ALPHA-TOCOPHEROL, beta carotene cancer prevention study group.The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in males smokers. *N.Eng.J.Med.*, Waltham, v.330., n.15, p. 1029-1035, 1994.
- ANILKUMAR,T.V., GOLDING,M., EDWARDS,R.J., LALANI,E.-N., SAFFAR, C.E., ALISON,M.R. The resistant hepatocyte model of carcinogenesis in the rat : the apparent independent development of oval cell proliferation and early nodules. *Carcinogenesis*, London, v.16,n.4,p.845-853,1995.
- ARNAUD,J., FORTIS,I., BLANCHIER,S., KIA,D., FAVIER,A. Simultaneous determination of retinol, alfa-tocopherol and beta-carotene by isocratic high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 572,n.1+2,p.103-116,1991.
- ASTORG,P., GRADELET,S., BERGÈS,R., SUSCHETET,M. No evidence for an inhibitory effect of  $\beta$ -carotene or of canthaxanthin on the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. *Nutr. Cancer*, Philadelphia, v.25,n.1,p.27-34,1996.
- BAKER, T.K., BACHOWSKI, S., STEVENSON, D.E., WALBORG JR., E.F., KLAUNIG,J.E. Modulation of gap junctional intercellular communication in rodent, monkey and human hepatocyte by nongenotoxic compounds. *Prog. Clin. Biol. Res.*, New York, v.391 (Growth factors and tumor promotion: implications for risk assessment),p.71-80,1995.
- BARTH, T.J., ZÖLLER, J., KÜBLER, A., BORN, A., OSSWALD, H. Redifferentiation of oral dysplastic mucosa by the application of the

- antioxidants beta-carotene,  $\alpha$ -tocopherol and vitamin C. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v.67,n.5,p.368-376,1997.
- BASU, T.K., TEMPLE, N.J., NG, J. Effects of dietary  $\beta$ -carotene on hepatic drug-metabolizing enzymes in mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, Tokyo, v.3,p. 95-102,1987.
- BEER,D.G., NEVEU,M.J., PAUL,D.L., RAPP,U.R., PITOT,H.C. Expression of the *c-raf* protooncogene,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, and gap junction protein in rat liver neoplasms. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.48,n.6, p. 1610-1617,1988.
- BENDICH,A. Carotenoids and the immune response. *J.Nutr.*,Philadelphia, v. 119,n.1,p.112-115, 1989.
- BENDICH, A.  $\beta$ -Carotene and the immune response. *Proc. Nutr. Soc.*, Cambridge, v.50,n.2,p.263-274, 1991.
- BENNIS, F., FAVRE, G., LE GAILLARD, F., SOULA, G. Importance of mevalonate-derived products in the control of HMG-CoA reductase activity and growth of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Int. J. Cancer* , Geneva, v.55,n.4,p.640-645,1993.
- BERTRAM, J.S., PUNG, A., CHURLEY, M., KAPPOCK, T.J., WILKINS, L.R., COONEY,R.V. Diverse carotenoids protect against chemically induced neoplastic transformation. *Carcinogenesis*, London, v.12,n.4,p.671-678, 1991.
- BERTRAM,J.S. The chemoprevention of cancer by dietary carotenoids: studies in mouse and human cells. *Pure Appl. Chem.*, London, v.66,n.5,p. 1025-1032,1994.
- BERTRAM, J.S., BORTKIEWICZ,H. Dietary carotenoids inhibit neoplastic transformation and modulate gene expression in mouse and human cells. *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda,v.62, n.6 (Suppl.), p.1327S-1336S,1995.
- BEX, V., MERCIER, T., CHAUMONTET, C., GAILLARD-SANCHEZ, I., FLECHON, B., MAZET, F., TRAUB, O.,MARTEL, P. Retinoic acid enhances connexin 43 expression at the post-transcriptional level in rat liver epithelial cells. *Cell Biochem. Funct.*, Guildford, v.13,n.1,p. 69-77,1995.

- BEYER,E.C., PAUL,D.L., GOODENOUGH,D.A. Connexin 43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.*, New York, v.105,n.6,part 1,p.2621-2629,1987.
- BEYER,E.C., PAUL,D.L., GOODENOUGH,D.A. Connexin family of gap junction proteins. *J. Membr. Biol.*, New York, v.116,n.3,p.187-194,1990.
- BIANCHI-SANTAMARIA,A., DELL` ORTI, M., FRIGOLI, G., GOBBI, M., ARNABOLDI, A., SANTAMARIA,L. Beta-carotene storage in rat organs following carrier mediated supplementation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v.64, n.1,p. 15-20,1994.
- BIESALSKI, H.-K., SCHÄFFER, M. Comparative assessment of the activity of beta-carotene, retinoyl-beta-D-glucoronide and retinoic acid growth and differentiation of a human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v.67,n.5,p.357-363,1997.
- BLOCK,G., PATTERSON,B., SUBAR,A. Fruits, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, Philadelphia, v.18, n.1, p.1-29, 1992.
- BLOT,W.J.,LI,J.Y.,TAYLOR,P.R.,GUO,W.,DAWSEY,S.,WANG,G.Q.,YANG,C. S.,ZHENG,S.-F.,GAIL,M.,LI,G.-Y.,YU,Y.,LIU, B. Q., TANGREA,J.,SUN, Y.-H.,LIU,F.,FRAUMENI JR.,J.F.,ZHANG,Y.-H.,LI,B.Nutrition intervention trials in Linxian, China : supplementation with specific vitamin / mineral combination, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population . *J. Natl. Cancer Inst.*, Bethesda, v.85, n.18, p. 1483-1491, 1993.
- BRALET,M.-P., BRANCHEREAU,S., BRECHOT,C., FERRY,N. Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. *Am. J. Pathol.*, Hagerstown, v.144,n.5,p.896-905,1994.
- BRAUN,L., MIKUMO,R., FAUSTO,N. Production of hepatocellular carcinoma by oval cells : cell cycle expression of c-myc and p53 at different stages of oval cell transformation. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.49,n.6,p. 1554-1561,1989.
- BRÜMMER,F., ZEMPEL,G., BÜHLE,P., STEIN,J.C., HÜLSER,D.F. Retinoic acid modulates gap junctional and permeability: a comparative study of



- dye spreading and ionic coupling in cultured cells. *Exp. Cell Res.*, New York, v.196,n.2,p.158-163,1991.
- BRUZZONE,R., WHITE,T.W., PAUL,D.L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.*, Berlin, v. 238,n.1,p.1-27,1996.
- BURRI,B.J. Beta-carotene and human health : a review of current research. *Nutr. Res.*, New York, v.17,n.3,p.547-580, 1997.
- BURTON,G.W. Antioxidant action of carotenoids. *J.Nutr.*, Philadelphia, v. 119,n.1,p.109-111,1989.
- BURTON, G.W., INGOLD, K.U.  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* , Washington, v.224,n.4649,p.569-573,1984.
- CESEN-CUMMINGS,K., FERNSTROM,M.J., MALKINSON,A.M., RUCH,R.J. Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. *Carcinogenesis*, London, v.19,n.1,p.61-67,1998.
- CHOMCZYNSKI,P., SACCHI,N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v.162,n.1,p.156-159,1987.
- DAGLI,M.L.Z. *Aspéctos morfológicos dos fígados de ratos tratados com beta-caroteno ou vitamina A e submetidos ao modelo do "hepatócito resistente" de carcinogênese*. São Paulo [Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo], 1994. 167p.
- DAGLI,M.L.Z., GUERRA,J.L., SINHORINI,I.L., WU,T.-S., RIZZI,M.B.S.L., PENTEADO,M.V.C., MORENO,F.S. Beta-carotene reduces the ductular (oval) cell reaction in the liver of Wistar rats submitted to the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. *Pathology*, Sidney, v.30,n.8,p. 259-266,1998.
- DE LUCA,L.M., ROSS,S.A. Beta-carotene increases lung cancer incidence in cigarette smokers. *Nutr. Rev.*, New York,v.54,n.6,p.178-180, 1996.
- DOLL,R. Nature and nurture: possibilities for cancer control. *Carcinogenesis*, London,v.17,n.2,p.177-184,1996.
- DRAGAN,Y.P., CAMPBELL,H.A., XU,X.-H., PITOT,H.C. Quantitative stereological studies of a selection protocol of hepatocarcinogenesis following

- initiation in neonatal male and female rats. *Carcinogenesis*, London, v. 18,n.1,p.149-158,1997.
- EDES, T.E., THORNTON JR., W.H., SHAH, J.  $\beta$ -Carotene and aryl hydrocarbon hydroxylase in the rat: an effect of  $\beta$ -carotene independent of vitamin A activity. *J. Nutr.*, Philadelphia, v.119,n.5,p.796-799,1989.
- EDES, T.E., GYSBERS, G.G., BUCKLEY, C.S., THORNTON JR., W.H. Exposure to the carcinogen benzopyrene depletes tissue vitamin A:  $\beta$ -carotene prevents depletion. *Nutr. Cancer*, Philadelphia, v.15,n.2,p. 159-166,1991.
- ELIAS,P.M., GRAYSON,S., CALDWELL,T.M., McNUTT,N.S. Gap junction proliferation in retinoic acid-treated human basal cell carcinoma. *Lab. Invest.*, Washington, v.42,n.4,p.469-474,1980.
- EPSTEIN,J.H. Effects of  $\beta$ -carotene on ultraviolet induced cancer formation in the hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.*, Oxford, v.25,n.2, p. 211-213, 1977.
- ERDMAN JR., J.W., RUSSELL, R.M., ROCK, C.L., BARUA, A.B., BOWEN, P.E., BURRI, B.J., CURRAN - CELENTANO, J., FURR, H., MAYNE, S.T., STACEWICZ- SAPUNTZAKIS,M. Beta-carotene and the carotenoids: beyond the intervention trials. *Nutr. Rev.*, New York, v.54,n.6, p. 1185-1188, 1996.
- ESINDUY,C.B., CHANG,C.C., TROSKO,J.E., RUCH,R.J. *In vitro* growth inhibition of neoplastically transformed cells by non-transformed cells: requirement for gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis*, London, v.16,n.4,p.915-921,1995.
- EVARTS, R.P., NAGY, P., MARSDEN, E.R., THORGEIRSSON, S.S. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis*, London, v.8,n.11,p.1737-1740,1987.
- EVARTS,R.P., NAGY, P., NAKATSUKASA, H., MARSDEN, E.R., THORGEIRSSON, S.S. *In vivo* differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.49,n.6,p.1541-1547,1989.
- EVARTS,R.P., NAKATSUKASA,H., MARSDEN,E.R., HSIA,C.-C.,DUNSFORD, H.A., THORGEIRSSON,S.S. Cellular and molecular changes in the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.50,n.11,p.3439-3444,1990.

- EVARTS,R.P., HU,Z., FUJIO,K., MARSDEN,E.R., THORGEIRSSON,S.S. Activation of hepatic stem cell compartment in the rat : role of transforming growth factor  $\alpha$ , hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation. *Cell Growth & Differ.*, Philadelphia, v.4,n.7,p. 555-561,1993.
- FACTOR,V.M., RADAIEVA,S.A., THORGEIRSSON,S.S. Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am. J. Pathol.*, Hagerstown, v.145,n.2,p.409-422,1994.
- FAO, WHO. *Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B<sub>12</sub>*. Rome: 1988. ( FAO Food and Nutrition Series, 23).
- FARBER,E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminobenzene. *Cancer Res.*,Philadelphia, v.16,n.1, p.142-148, 1956.
- FARIS,R.A., MONFILS,B.A., DUNSFORD,H.A., HIXSON,D.C. Antigenic relationship between oval cells and a subpopulation of hepatic foci, nodules, and carcinomas induced by the "Resistant Hepatocyte" model system. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.51,n.4,p.1308-1317,1991.
- FIORIO,W.A.B. *Aspéctos morfológicos e imuno-histoquímicos de fígados de ratos tratados com  $\beta$ -caroteno e vitamina A em estágios precoces de carcinogênese, no modelo do hepatócito resistente*. São Paulo [Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo], 1998. 117p.
- FITZGERALD, D.J., MESNIL, M., OYAMADA, M., TSUDA, H., ITO, N., YAMASAKI, H. Changes in gap junction protein (connexin 32) gene expression during rat liver carcinogenesis. *J. Cell. Biochem.*, New York, v. 41,n.2,p.97-102,1989.
- FITZGERALD,D.J., FUSENIG,N.E., BOUKAMP,P., PICCOLI,C., MESNIL,M., YAMASAKI,H. Expression and function of connexin in normal and transformed human keratinocytes in culture. *Carcinogenesis*, London, v. 15,n.9,p.1859-1865,1994.
- FROMMEL,T.O., LIETZ,H., MOBARHAN,S. Expression of mRNA for the gap-junctional protein connexin 43 in human colonic tissue is variable in

- response to  $\beta$ -carotene supplementation. *Nutr. Cancer*, Philadelphia, v. 22,n.3,p.257-265,1994.
- FURR, H.C., CLARK, R.M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *J. Nutr. Biochem.*, New York, v.8,n.7,p.364-377,1997.
- GAD,S.C., WEIL,C.S. Statistics for toxicologists. In : HAYES,A.W. *Principles and methods of toxicology*. 2.ed. New York: Raven, 1989. p.435-483.
- GAREWAL,H.S. Antioxidants in oral cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.62,Suppl.6, p. 1410S-1416S, 1995.
- GAREWAL,H.S., SHAMDAS,G.J. Intervention trials with beta-carotene in precancerous conditions of the upper aerodigestive tract. In: Bendich, A., Butterworth Jr., C.E. , ed. *Micronutrients in health and in disease prevention*. New York:Marcel Dekker,1991. Cap.6, p.127-140.
- GERLYNG,P., GROTMOL,T., STOKKE,T., ERIKSTEIN,B., SEGLEN,P.O. Flow cytometric investigation of a possible precursor-product relationship between oval cells and parenchymal cells in the rat liver. *Carcinogenesis*, London, v.15,n.1,p.53-59,1994.
- GERMAIN,L., NOËL,M., GOURDEAU,H., MARCEAU,N. Promotion of growth and differentiation of rat ductular oval cells in primary culture. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.48,n.2,p.368-378,1988.
- GERSTER, H. Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v.63, n.2, p.93-121, 1993.
- GERSTER,H.  $\beta$ -carotene, vitamin E and vitamin C in different stages of experimental carcinogenesis. *Eur.J.Clin.Nutr.*, London, v.49, n.2, p. 155-168, 1995.
- GIJARE,P.S., RAO,K.V.K., BHIDG,S.V. Modulatory effects of snuff, retinoic acid, and  $\beta$ -carotene on DMBA - induced hamster cheek pouch carcinogenesis in relation to keratin expression. *Nutr. Cancer*, Philadelphia, v.14, n.3&4, p.253-259,1990.
- GOLDING,M., SARRAF,C.E., LALANI,E.-N., ANILKUMAR,T.V., EDWARDS, R.J., NAGY, P., THORGEIRSSON, S.S., ALISON, M.R. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene - treated regenerating rat liver. *Hepatology*, New York, v.22,n.4, part 1,p. 1243-1253,1995.

- GOODENOUGH,D.A., GOLIGER,J.A., PAUL,D.L. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v.65, p. 475-502,1996.
- GOYETTE,M., FARIS,R., BRAUN,L., HIXSON,D., FAUSTO,N. Expression of hepatocyte and oval cell antigens in hepatocellular carcinomas produced by oncogene-transfected liver epithelial cells. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.50,n.15,p.4809-4817,1990.
- GRADELET, S. , LEBON, A.M., SUSCHELET, M., ASTORG, P. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B<sub>1</sub> - induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism. *Carcinogenesis*, London, v.19, n.3, p.403-411, 1998.
- GROSS, M.D., BISHOP, T.D., BELCHER, J.D., JACOBS JR., D.R. Induction of HL-60 cell differentiation by carotenoids. *Nutr. Cancer*, Philadelphia, v. 27,n.2,p.169-173,1997.
- GUO,H., ACEVEDO,P., DON PARSA,F., BERTRAM,J.S. Gap-junctional protein connexin 43 is expressed in dermis and epidermis of human skin: differential modulation by retinoids. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v.99,n. 4,p.460-467,1992.
- HANUSCH, M., STAHL, W., SCHULZ, W.A., SIES, H. Induction of gap junctional communication by 4-oxo-retinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.317,n.2, p.423-428,1995.
- HE,Y., ROOT, M.M., PARKER, R.S., CAMPBELL, T.C. Effects of carotenoid-rich food extracts on the development of preneoplastic lesions in rat liver and on *in vivo* and *in vitro* antioxidant status. *Nutr. Cancer*, Philadelphia, v. 27,n.3,p.238-244, 1997.
- HENNEKENS, C.H., BURING, J.E., MANSON, J.E., STAMPFER, M., ROSNER,B., COOK, N.R.,BELANGER,C., LAMOTTE,F., GAZIANO,J.M., RIDKER,P.M.,WILLETT,W., PETO,R. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N. Eng. J. Med.*,Waltham, v.334, n.18, p.1145-1149,1996.
- HIXSON,D.G., FARIS,R.A., THOMPSON,N.L. An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis. *Pathobiology*, Basel, v.58,n.2,p.65-77,1990.

- HIXSON,D.C., CHAPMAN,L., McBRIDE,A., FARIS,R., YANG,L. Antigenic phenotypes common to rat oval cells, primary hepatocellular carcinomas and developing bile ducts. *Carcinogenesis*, London, v.18,n.6,p. 1169-1175,1997.
- HORN,V., MINUCCI,S., OGRYZKO,V.V., ADAMSON,E.D., HOWARD,B.H., LEVIN, A. A., OZATO,K. RAR and RXR selective ligands cooperatively induce apoptosis and neuronal differentiation in P19 embryonal carcinoma cells. *FASEB J.*, Bethesda, v.10,n.9,p.1071-1077,1996.
- HOSSAIN, M.Z., WILKENS, L.R., MEHTA, P.P., LOEWENSTEIN, W.R., BERTRAM,J.S. Enhancement of gap junctional communication by retinoids correlates with their ability to inhibit neoplastic transformation. *Carcinogenesis*, London, v.10,n.9,p.1743-1748,1989.
- HSIA,C.C., EVARTS, R.P., NAKATSUKASA, H., MARSDEN, E.R., THORGEIRSSON, S.S. Occurrence of oval-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, New York, v.16,n.6,p.1327-1333,1992.
- HSU,S.-M., RAINE,L., FANGER,H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, Philadelphia, v.75,n.5,p.734-738,1981.
- HU,Z., EVARTS,R.P., FUJIO,K., MARSDEN,E.R., THORGEIRSSON,S.S. Expression of hepatocyte growth factor and *c-met* genes during hepatic differentiation and liver development in the rat. *Am. J. Pathol.*, Hagerstown, v.142,n.6,p.1823-1830,1993.
- IFTIKHAR,S., LIETZ,H., MOBARHAN,S., FROMMEL,T.O. In vitro  $\beta$ -carotene toxicity for human colon cancer cells. *Nutr. Cancer*, Philadelphia, v.25, n. 3, p.221-230, 1996.
- IMAI,T., MASUI,T., NAKANISHI,H., INADA,K.-I., KOBAYASHI,K., NAKAMURA, T., TATEMATSU,M. Expression of hepatocyte growth factor and *c-met* mRNAs during rat chemically induced hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, London, v.17,n.1,p.19-24,1996.
- IMAI,T., MASUI,T., ICHINOSE,M., NAKANISHI,H., YANAI,T., MASEGI,T., MURAMATSU,M., TATEMATSU,M. Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by *in situ* hybridization. *Carcinogenesis*, London, v.18,n.3, p.545-551,1997.

- IRVING,C.C. Comparative toxicity of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in several strains of rats. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.35,n.11,p. 2959-2961,1975.
- IYAMA,T., TAKASUGA,A., AZUMA,M.  $\beta$ -Carotene accumulation in mouse tissues and a protective role against lipid peroxidation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v.66,n.4,p.301-305,1996.
- JONES,C.S., SLY,L., CHEN,L.-C., BEN,T., BRUGH-COLLINS,M., LICHTI, U., DE LUCA,L.M. Retinol and  $\beta$ -carotene concentrations in skin, papillomas and carcinomas, liver, and serum of mice fed retinoic acid or  $\beta$ -carotene to suppress skin tumor formation. *Nutr. Cancer*, Philadelphia, v.21,n.1,p. 83-93,1994.
- JOU, Y.-S., LAYHE, B., MATESIC, D.F., CHANG, C.-C., FEIJTER, A.W., LOCKWOOD, L., WELSCH, C.W., KLAUNIG, J.E., TROSKO, J.E. Inhibition of gap junctional intercellular communication and malignant transformation of rat liver epithelial cells by *neu* oncogene. *Carcinogenesis*, London, v.16,n.2,p.311-317,1995.
- KENNEDY, A.R., KRINSKY, N.I. Effects of retinoids,  $\beta$ -carotene, and canthaxanthin on uv- and x-ray- induced transformation of C3H10T1/2 cells *in vitro*. *Nutr. Cancer*, Philadelphia, v.22,n.3,p.219-232,1994.
- KENNEDY,S., RETTINGER,S., FLYE,M.W., PONDER,K.P. Experiments in transgenic mice show that hepatocytes are the source for postnatal liver growth and do not stream. *Hepatology*, New York, v.22,n.1,p. 160-168,1995.
- KING,T.J., KHACHIK,F., BORTKIEWICZ,H., FUKUSHIMA,L.H., MORIOKA, S., BERTRAM,J.S. Metabolites of dietary carotenoids as potential cancer preventive agents. *Pure & Appl. Chem.*, London, v.69,n.10, p. 2135-2140,1997.
- KOO, L.C. Diet and lung cancer 20 + years later: more questions than answers? *Int. J. Cancer*, Geneva, Suppl.10,p.22-29,1997.
- KREN, B.T., KUMAR, N.M., WANG, S.-Q., GILULA, N.B., STEER, C.J. Differential regulation of multiple gap junction transcripts and proteins during rat liver regeneration. *J. Cell Biol.*, New York, v.123,n.3,p. 707-718,1993.

- KRINSKY, N.I. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. *The Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.53,n.1,p.238S-246S, 1991.
- KRINSKY, N.I. Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.*, Palo Alto, v.13, p.561-587, 1993.
- KRUTOVSKIKH, V.A., OYAMADA, M., YAMASAKI, H. Sequential changes of gap-junctional intercellular communications during multistage rat liver carcinogenesis: direct measurement of communication *in vivo*. *Carcinogenesis*, London, v.12,n.9,p.1701-1706, 1991.
- KRUTOVSKIKH, V.A., MAZZOLENI, G., MIRONOV, N., OMORI, Y., AGUELON, A.-M., MESNIL, M., BERGER, F., PARTENSKY, C., YAMASAKI, H. Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32. *Int. J. Cancer*, Geneva, v.56,n.1, p. 87-94, 1994.
- KRUTOVSKIKH, V.A., MESNIL, M., MAZZOLENI, G., YAMASAKI, H. Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor - promoting agents in vivo. *Lab. Invest.*, Washington, v.72,n.5,p.571-577, 1995.
- KUMAR, N.M., GILULA, N.B. Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.*, New York, v. 103,n.3,p.767-776, 1986.
- KUMAR, N.M., GILULA, N.B. The gap junction communication channel. *Cell*, Cambridge, v.84,n.3,p.381-388, 1996.
- KURIE, J.M., BUCK, J., EPPINGER, T.M., MOY, D., DMITROVSKY, E. 9-*Cis* and all-*trans* retinoic acid induce a similar phenotype in human teratocarcinoma cells. *Differentiation*, Berlin, v.54,p.123-129, 1993.
- LAIRD, D.W. The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J. Bioenerg. Biomembr.*, New York, v.28,n.4,p.311-318, 1996.
- LANGSETH, L. *Nutritional epidemiology* : possibilities and limitations. Washington : ILSI, 1996. p.17-18. (ILSI Europe Concise Monograph Series).
- LEE, S.W., TOMASETTO, C., PAUL, D., KEYOMARSI, K., SAGER, R. Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J. Cell Biol.*, New York, v.118,n.5,p.1213-1221, 1992.



- LE MARCHAND, L., HANKIN, J.H., KOLONEL, L.N., BEECHER, G.R., WILKENS, L.R., ZHAO, L.P. Intake of specific carotenoids and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.*, Philadelphia, v.2,p. 183-187,1993.
- LEMIRE,J.M., FAUSTO,N. Multiple  $\alpha$ -fetoprotein RNAs in adult rat liver : cell type-specific expression and differential regulation. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.51,n.18,p.4656-4664,1991.
- LEMIRE,J.M., SHIOJIRI,N., FAUSTO,N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am. J. Pathol.*, Hagerstown, v.139,n.3,p.535-552,1991.
- LEVY, J., BOSIN, E., FELDMAN, B., GIAT, Y., MIINSTER, A., DANILENKO, M., SHARONI, Y. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either  $\alpha$ -carotene or  $\beta$ -carotene. *Nutr. Cancer*, Philadelphia, v.24,n.3,p.257-266,1995.
- LOEWENSTEIN, W.R. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol.Rev.*,Bethesda,v.61,n.4,p.829-913,1981.
- LOEWENSTEIN,W.R., KANNO,Y. Intercellular communication and control of growth: lack of communication between cancer cells. *Nature*, London, v. 209,n.5029,p.1248-1249,1966.
- LOEWENSTEIN,W.R., KANNO,Y. Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth. *J. Cell Biol.*, New York, v.33,n.2,p. 225-234,1967.
- LOEWENSTEIN, W.R., ROSE, B. The cell-cell channel in the control of growth. *Semin. Cell Biol.*, London, v.3,p.59-79,1992.
- LOTAN, R. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.*, Bethesda, v.10, n.9,p.1031-1039,1996.
- MANGELSDORF,D.J. Vitamin A receptors. *Nutr. Rev.*, New York, v.52,n.2 (Part II),p.S32-S44,1994.
- MANORAMA, R., CHINNASAMY, N., RUKMINI, C. Effect of red palm oil on some hepatic drug-metabolizing enzymes in rats. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, v.31,n.8,p.583-588,1993.
- MARKERT,C. Neoplasia: a disease of cell differentiation. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.28,n.9,p.1908-1914,1968.

- MATHEWS-ROTH, M.M. Antitumor activity of  $\beta$ -carotene, canthaxanthin and phytoene. *Oncology*, Basel, v.39,n.1,p.33-37,1982.
- MATHEWS-ROTH,M.M. Carotenoids and cancer prevention - experimental and epidemiological studies. *Pure Appl. Chem.*, London, v.57, n.5, p.717-722, 1985.
- MATHEWS-ROTH,M.M., KRINSKY,N.I. Carotenoids affect development of UV-B induced skin cancer. *Photochem. Photobiol.*, Oxford, v.46, n.4, p. 507-509, 1987.
- MAYNE,S.T. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J.*, Bethesda, v.10,n.7,p.690-701,1996.
- MEHTA,P.P., BERTRAM,J.S., LOEWENSTEIN,W.R. Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell*, Cambridge, v.44,n.1,p.187-196,1986.
- MEHTA,P.P., BERTRAM,J.S., LOEWENSTEIN,W.R. The actions of retinoids on cellular growth correlate with their actions on gap junctional communication. *J. Cell Biol.*, New York, v.108,n.3,p.1053-1065,1989.
- MEHTA, P.P., HOTZ-WAGENBLATT, A., ROSE, B., SHALLOWAY, D., LOEWENSTEIN,W.R. Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J. Membr. Biol.*, New York, v.124,n.3,p.207-225,1991.
- MERCIER, T., HONIKMAN-LEBAN, E., CHAUMONTET, C., MARTEL, P., SHAHIN,M.M. Studies on the modulating effects of retinoic acid and retinol acetate using dye transfer and metabolic cooperation assays. *Fundam. Appl. Toxicol.*, Akron, v.21,p.270-276,1993.
- MESNIL,M., YAMASAKI,H. Selective gap-junctional communication capacity of transformed and non-transformed rat liver epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, London, v.9,n.8,p.1499-1502,1988.
- MOON, R.C., MEHTA, R.G., RAO, K.V.N. Retinoids and cancer in experimental animals. In: Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S. *The retinoids: biology, chemistry, and medicine*. 2th ed. New York : Raven Press, 1994. p.573-595.
- MORENO,F.S., RIZZI,M.B.S.L., DAGLI,M.L.Z., PENTEADO,M.C.V. Inhibitory effects of  $\beta$ -carotene on preneoplastic lesions induced in wistar rats by

- the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis*, London, v.12,n.10, p. 1817-1822, 1991.
- MORENO, F.S., WU, T.-S., PENTEADO, M.C.V., RIZZI, M.B.S.L., JORDÃO JR., A.A., ALMEIDA-MURADIAN, L.B., DAGLI, M.L.Z. A comparison of  $\beta$ -carotene and vitamin A effects on a hepatocarcinogenesis model. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v.65,n.2,p.87-94, 1995a.
- MORENO, F.S., ROSSIELLO, M.R., MANJESHWAR, S., NATH, R., RAO, P.M., RAJALAKSHMI, S., SARMA, D.S.R. Effect of  $\beta$ -carotene on expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. *Cancer Lett.*, Shannon, v.96,n.2,p.201-208, 1995b.
- NAGY, P., EVARTS, R.P., MARSDEN, E., ROACH, J., THORGEIRSSON, S.S. Cellular distribution of *c-myc* transcripts during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.48,n.19,p.5522-5527, 1988.
- NAGY, P., BISGAARD, H.C., THORGEIRSSON, S.S. Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. *J. Cell Biol.*, New York, v.126,n.1,p.223-233, 1994.
- NAVES, M.M.V. Beta-caroteno e câncer. *Rev. Nutr.*, Campinas, v.11, n.2, p. 99-115, 1998.
- NAVES, M.M.V., MORENO, F.S.  $\beta$ -carotene and cancer chemoprevention: from epidemiological associations to cellular mechanisms of action. *Nutr. Res.*, New York, v.18,n.10, p. 1807-1824, 1998.
- NEVEU, M.J., HULLY, J.R., BABCOCK, K.L., HERTZBERG, E.L., NICHOLSON, B.J., PAUL, D.L., PITOT, H.C. Multiple mechanisms are responsible for altered expression of gap junction genes during oncogenesis in rat liver. *J. Cell Sci.*, London, v.107, part 1, p.83-95, 1994.
- NEVEU, M.J., HULLY, J.R., BABCOCK, K.L., VAUGHAN, J., HERTZBERG, E.L., NICHOLSON, B.J., PAUL, D.L., PITOT, H.C. Proliferation-associated differences in the spatial and temporal expression of gap junction genes in rat liver. *Hepatology*, New York, v.22,n.1,p.202-212, 1995.
- NICHOLSON, B., DERMIETZEL, R., TELOW, D., TRAUB, O., WILLECKE, K., REVEL, J.P. Two homologous protein components of hepatic gap junctions. *Nature*, London, v.329,n.6141,p.732-734, 1987.

- NIKAWA, T., SCHULZ, W.A., VAN DEN BRINK, C.E., HANUSCH, M., VAN DER SAAG, P., STAHL, W., SIES, H. Efficacy of all-*trans*- $\beta$ -carotene, canthaxanthin, and all-*trans*-, 9-*cis*-, and 4-oxoretinoic acids in inducing differentiation of an F9 embryonal carcinoma RAR- $\beta$ -*lac Z* reporter cell line. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.316,n.2,p.665-672,1995.
- OLSON, J.A. Biological actions of carotenoids. *J. Nutr.*, Philadelphia, v.119, n. 1,p.94-95, 1989.
- OLSON, J.A. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. *J. Nutr.*, Philadelphia, v.126 ,Suppl.4,p.1208S-1212S, 1996.
- OMENN, G.S., GOODMAN, G.E., THORNOUIST, M.D., BALMES, J., CULLEN, M.R., GLASS, A., KEOGH, J.P., MEYSKENS JR., F.L., VALANIS, B., WILLIAMS JR., J.H., BARNHART, S., HAMMAR, S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Eng. J. Med.*, Waltham, v.334,n.18,p.1150-1155, 1996.
- OPIE, E.L. The pathogenesis of tumors in the liver produced by butter yellow. *J. Exp. Med.*, New York, v.80,n.3,p.231-246,1944.
- OYAMADA, M., KRUTOVSKI KH, V.A., MESNIL, M., PARTENSKY, C., BERGER, F., YAMASAKI, H. Aberrant expression of gap junction gene in primary human hepatocellular carcinomas: increased expression of cardiac-type gap junction gene connexin 43. *Mol. Carcinog.*, New York, v.3,p. 273-278,1990.
- PALOZZA, P. Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutr. Rev.*, New York, v.56,n.9,p.257-265,1998.
- PALOZZA, P., KRINSKY, N.I. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview. *Methods. Enzymol.*, New York, v.213, p.403-420,1992.
- PARKER, R.S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.*, Bethesda, v.10,n.5,p.542-551, 1996.
- PARKIN, D.M., PISANI, P., FERLAY, J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int. J. Cancer*, Geneva, v.54, n.4, p. 594-606, 1993.
- PAUL, D.L. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.*, New York, v.103,n.1,p.123-134,1986.

- PAUL,D.L. New functions for gap junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, London, v. 7,n.5,p.665-672,1995.
- PETO,R., DOLL,R., BUCKLEY,J.D., SPORN,M.B. Can dietary  $\beta$ -carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*, London, v.290, n.5803, p. 201-208, 1981.
- PIERCE,G.B., JOHNSON,L.D. Differentiation and cancer. *In Vitro*, Rockville, v. 7,p.140-145,1971.
- PIJNAPPEL,W.W.M., HENDRIKS,H.F.J., FOLKERS,G.E., VAN DEN BRINK, C.E., DEKKER,E.J., EDELENBOSCH,C., VAN DER SAAG,P.T., DURSTON, A.J. The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. *Nature*, London, v.366,n.6452, p.340-344,1993.
- PITOT,H.C., DRAGAN,Y.P. Chemical carcinogenesis. In: Klaassen,C.D., ed. *Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons*. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p.201-267.
- PONDER,K.P. Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies. *FASEB J.*, Bethesda, v.10.n.7, p. 673-684,1996.
- POTTER, J.D.  $\beta$ -Carotene and the role of intervention studies. *Cancer Lett.*, Shannon, v.114,n.1,2, p.329-331,1997.
- PUNG,A., RUNDHAUG, E., YOSHIZAWA, C.N., BERTRAM,J.S.  $\beta$ -carotene and canthaxanthin inhibit chemically- and physically- induced neoplastic transformation in 10T1/2 cells. *Carcinogenesis*, London,v.9, n.9, p. 1533-1539, 1988.
- RADAEVA,S., STEINBERG,P. Phenotype and differentiation patterns of the oval cell lines OC/CDE 6 and OC/CDE 22 derived from the livers of carcinogen-treated rats. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.55, n.5, p. 1028-1038,1995.
- RAUTALAHTI, M., ALBANES, D., VIRTAMO, J., TAYLOR,P.R., HUTTUNEN, J.K., HEINONEN, O.P. Beta-carotene did not work: aftermath of the ATBC study. *Cancer Lett.*, Shannon, v.114, n.1,2, p.235-236,1997.
- REN,P., MEHTA,P.P., RUCH,R.J. Inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoters in connexin 43 and connexin 32 – expressing liver cells: cell specificity and role of protein kinase C. *Carcinogenesis*, London, v.19,n.1,p.169-175,1998.

- RHIM, J.A., SANDGREN, E.P., DEGEN, J.L., PALMITER, R.D., BRINSTER, R.L.  
Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transformation.  
*Science*, Washington, v.263, n.5150, p.1149-1152, 1994.
- RIZZI, M.B.S.L., DAGLI, M.L.Z., JORDÃO JR., A.A., PENTEADO, M.V.C.,  
MORENO, F.S.  $\beta$ -carotene inhibits persistent and stimulates remodeling  
 $\gamma$ GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of  
hepatocarcinogenesis. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v.67, n.6, p.  
415-422, 1997.
- ROGERS, M., BERESTECKY, J.M., HOSSAIN, M.C., GUO, H., KADLE, R.,  
NICHOLSON, B.J., BERTRAM, J.S. Retinoid-enhanced gap junctional  
communication is achieved by increased levels of connexin 43 mRNA and  
protein. *Mol. Carcinog.*, New York, v.3, p.335-343, 1990.
- ROSE, B., MEHTA, P.P., LOEWENSTEIN, W.R. Gap-junction protein gene  
suppresses tumorigenicity. *Carcinogenesis*, London, v.14, n.5, p.  
1073-1075, 1993.
- ROSENBERG, E., SPRAY, D., REID, L. Transcriptional and post transcriptional  
control of connexin mRNAs in periportal and pericentral rat hepatocytes.  
*Eur. J. Cell Biol.*, Stuttgart, v.59, n.1, p.21-26, 1992.
- ROSS, C.A., TERNUS, M.E. Vitamin A as a hormone: recent advances in  
understanding the actions of retinol, retinoic acid, and beta carotene. *J.  
Am. Diet. Assoc.*, Chicago, v.93, n.11, p.1285-1290, 1993.
- ROUSSEAU, E.J., DAVISON, A.J., DUNN, B. Protection by  $\beta$ -carotene and  
related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and  
genotoxicity : implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Free  
Rad. Biol. Med.*, New York, v.13, n.4, p.407-433, 1992.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular cloning* : a laboratory  
manual. 2.ed. New York : Cold Spring Harbor (CSH), 1989. v.1. Cap.7 –  
Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic  
cells. p.7.3-7.87.
- SARKAR, A., MUKHERJEE, B., CHATTERJEE, M. Inhibitory effect of  $\beta$ -  
carotene on chronic 2 - acetylaminofluorene induced hepato-  
carcinogenesis in rat : reflection in hepatic drug metabolism.  
*Carcinogenesis*, London, v.15, n.5, p.1055-1060, 1994.

- SARKAR, A., MUKHERJEE, B., CHATTERJEE, M. Inhibition of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene - induced hepatocarcinogenesis in rat by dietary  $\beta$ -carotene: changes in hepatic antioxidant defense enzyme levels. *Int. J. Cancer*, Geneva, v.61,n.6,p.799-805,1995.
- SATOH,K., KITAHARA,A., SOMA,Y., INABA,Y., HATAYAMA,I., SATO,K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase : a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington, v. 82,n.12,p.3964-3968,1985.
- SCHWATZ, J., SHKLAR, G. The selective effect of carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol on human cancer cell lines *in vitro*. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Chicago, v.50,p.367-373,1992.
- SCOTT,R.E. Differentiation, differentiation / gene therapy and cancer. *Pharmacol. Ther.*, Oxford, v.73,n.1,p.51-65,1997.
- SELL,S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res.*, Philadelphia, v.50,n.13, p. 3811-3815,1990.
- SELL,S. The role of determined stem-cells in the cellular lineage of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Dev. Biol.*, Vizcaya, v.37,p.189-201, 1993.
- SELL,S., LEFFERT,H.L. An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, New York, v.2,n. 1,p.77-86,1982.
- SELL,S., DUNSFORD,H.A. Evidence for the stem cell origin of hepato- cellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am. J. Pathol.*, Hagerstown, v.134,n. 6,p.1347-1363,1989.
- SELL,S., PIERCE,G.B. Maturation arrest of stem cell differentiation in a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab. Invest.*, Washington, v.70,n.1,p.6-22,1994.
- SEMPLE-ROBERTS, E., HAYES, M.A., ARMSTRONG, D., BECKER, R.A., RACZ, W.J., FARBER, E. Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene. *Int.J.Cancer*, Geneva, v.40,n.5,p.643-645,1987.

- SHAPIRO, S.S., MOTT, D.J., MACHLIN, L.J. Kinetic characteristics of  $\beta$ -carotene uptake and depletion in rat tissue. *J. Nutr.*, Philadelphia, v.114, n.10, p.1924-1933, 1984.
- SHEKELLE, R.B., LIU, S., RAYNOR JR., W.J., LEPPER, M., MALIZA, C., ROSSOF, A.H. Dietary vitamin A and risk of cancer in the Western Electric Study. *Lancet*, London, v.II, n.8257, p.1185-1189, 1981.
- SIES, H., STAHL, W. Carotenoids and intercellular communication via gap junctions. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v.67, n.5, p.364-367, 1997.
- SIGAL, S.H., BRILL, S., FIORINO, A.S., REID, L.M. The liver as a stem cell and lineage system. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol.)*, Baltimore, v.26, n.2, p.G139-G148, 1992.
- SILVEIRA, E.R. *Efeitos da administração de vitamina A e dos ácidos retinóicos todo-trans e 9-cis a ratos Wistar na etapa de progressão de modelo de hepatocarcinogênese*. São Paulo [Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo], 1998. 97p.
- SILVEIRA, E.R., MORENO, F.S. Natural retinoids and  $\beta$ -carotene: from food to their actions on gene expression. *J. Nutr. Biochem.*, New York, v.9, n.8, p.446-456, 1998.
- SIMPSON, I., ROSE, B., LOEWENSTEIN, W.R. Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science*, Washington, v.195, n.4275, p.294-296, 1977.
- SOLT, D.T., FARBER, E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, London, v.263, n.5579, p.701-703, 1976.
- SOMA, M.R., CORSINI, A., PAOLETTI, R. Cholesterol and mevalonic acid modulation in cell metabolism and multiplication. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v.64/65, n.1, p.1-15, 1992.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel eletroforesis. *J. Mol. Biol.*, London, v.98, n.3, p.503-517, 1975.
- SPORN, M.B., ROBERTS, A.B. What is a retinoid? *Ciba. Found. Symp.*, London, v.113, n.1, p.1-5, 1985.



- STÄHELIN, H.B., GEY, K.F., EICHHOLZER, M., LÜDIN, E.  $\beta$ -Carotene and cancer prevention : the Basel Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.53, Suppl.1, p.265S-269S, 1991.
- STAHL, W., SUNDQUIST, A.R., HANUSCH, M., SCHWARZ, W., SIES, H. Separation of beta-carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, v.39, n.5, p.810-814, 1993.
- STAHL, W., NICOLAI, S., BRIVIBA, K., HANUSCH, M., BROSZEIT, G., PETERS, M., MARTIN, H.-D., SIES, H. Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. *Carcinogenesis*, London, v.18, n.1, p.89-92, 1997.
- STAHL, W., SIES, H. The role of carotenoids and retinoids in gap junctional communication. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v.68, n.6, p.354-359, 1998.
- STEINBERG, P., STEINBRECHER, R., RADAIEVA, S., SCHIRMACHER, P., DIENES, H.P., OESCH, F., BANNASCH, P. Oval cell lines OC/CDE 6 and OC/CDE 22 give rise to cholangio-cellular and undifferentiated carcinomas after transformation. *Lab. Invest.*, Washington, v.71, n.5, p.700-709, 1994.
- STICH, H.F., DUNN, B.P. Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents. *Int. J. Cancer*, Geneva, v.38, n.5, p.713-717, 1986.
- STICH, H.F., ROSIN, M.P., HORNBY, A.P., MATHEW, B., SANKARANA-RAYANAN, R., NAIR, M.K. Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *Int. J. Cancer*, Geneva, v.42, n.2, p.195-199, 1988.
- STUTENKEMPER, R., GEISSE, S., SCHWARTZ, H.J., LOOK, J., TRAUB, O., NICHOLSON, B.J., WILLECKE, K. The hepatocyte-specific phenotype of murine liver cells correlates with high expression of connexin 32 and connexin 26 but very low expression of connexin 43. *Exp. Cell Res.*, New York, v.201, n.1, p.43-54, 1992.
- SUDA, D., SCHWARTZ, J., SHKLAR, G. Inhibition of experimental oral carcinogenesis by topical beta carotene. *Carcinogenesis*, London, v.7, n.5, p.711-715, 1986.
- SULLIVAN, R., RUANGVORAVAT, C., JOO, D., MORGAN, J., LIN WANG, B., KANG WANG, X., LO, C.W. Structure, sequence and expression of the

- mouse cx 43 gene encoding connexin 43. *Gene*, Amsterdam, v.130, n.2,p. 191-199,1993.
- TATEMATSU,M., HO,R.H., KAKU,T., EKEM,J.K., FARBER,E. Studies on proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. *Am. J. Pathol.*, Hagerstown, v.114,n.3,p.418-430,1984.
- TATEMATSU,M., MERA,Y., INOUE,T., SATOH,K., SATO,K., ITO,N. Stable phenotypic expression of glutathione S-trasnferase placental type and instable phenotypic expression of  $\gamma$ -glutamyltransferase in rat liver preneoplastic and neoplastic lesions. *Carcinogenesis*, London, v.9,n.2, p. 215-220,1988.
- TEE,L.B.G., KIRILAK,Y., HUANG,W.-H., MORGAN,R.H., YEOH,G.C.T. Differentiation of oval cells into duct-like cells in preneoplastic liver of rats placed on a choline-deficient diet supplemented with ethionine. *Carcinogenesis*, London, v.15,n.12,p.2747-2756,1994.
- TEE,L.B.G., KIRILAK,Y., HUANG,W.-H., SMITH,P.G.J., MORGAN,R.H., YEOH,G.C.T. Dual phenotypic expression of hepatocytes and bile ductular markers in developing and preneoplastic rat liver. *Carcinogenesis*, London, v.17,n.2,p.251-259,1996.
- THORGEIRSSON,S.S. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J.*, Bethesda, v.10,n.11,p.1249-1256,1996.
- THORGEIRSSON,S.S., EVARTS,R.P., BISGAARD,H.C., FUJIO,K., HU,Z. Hepatic stem cell compartment : activation and lineage commitment. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Baltimore, v.204,n.3,p.253-260,1993.
- TROSKO,J.E., CHANG,C.C., MADHUKAR,B.V., KLAUNIG,J.E. Chemical, oncogene and growth factor inhibition of gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. *Pathobiology*, Basel, v.58,n.4,p.265-278,1990.
- TROSKO,J.E., CHANG,C.C., MADHUKAR,B.V. The role of modulated gap junctional intercellular communication in epigenetic toxicology. *Risk Anal.*, New York, v.14,n.3,p.303-312,1994.
- TSUDA,H., ASAMOTO,M., BABA,H., IWAHORI,Y., MATSUMOTO,K., IWASE,T., NISHIDA,Y., NAGAO,S., HAKOI,K., YAMAGUCHI,S., OZAKI, K.,YAMASAKI,H. Cell proliferation and advancement of hepato-

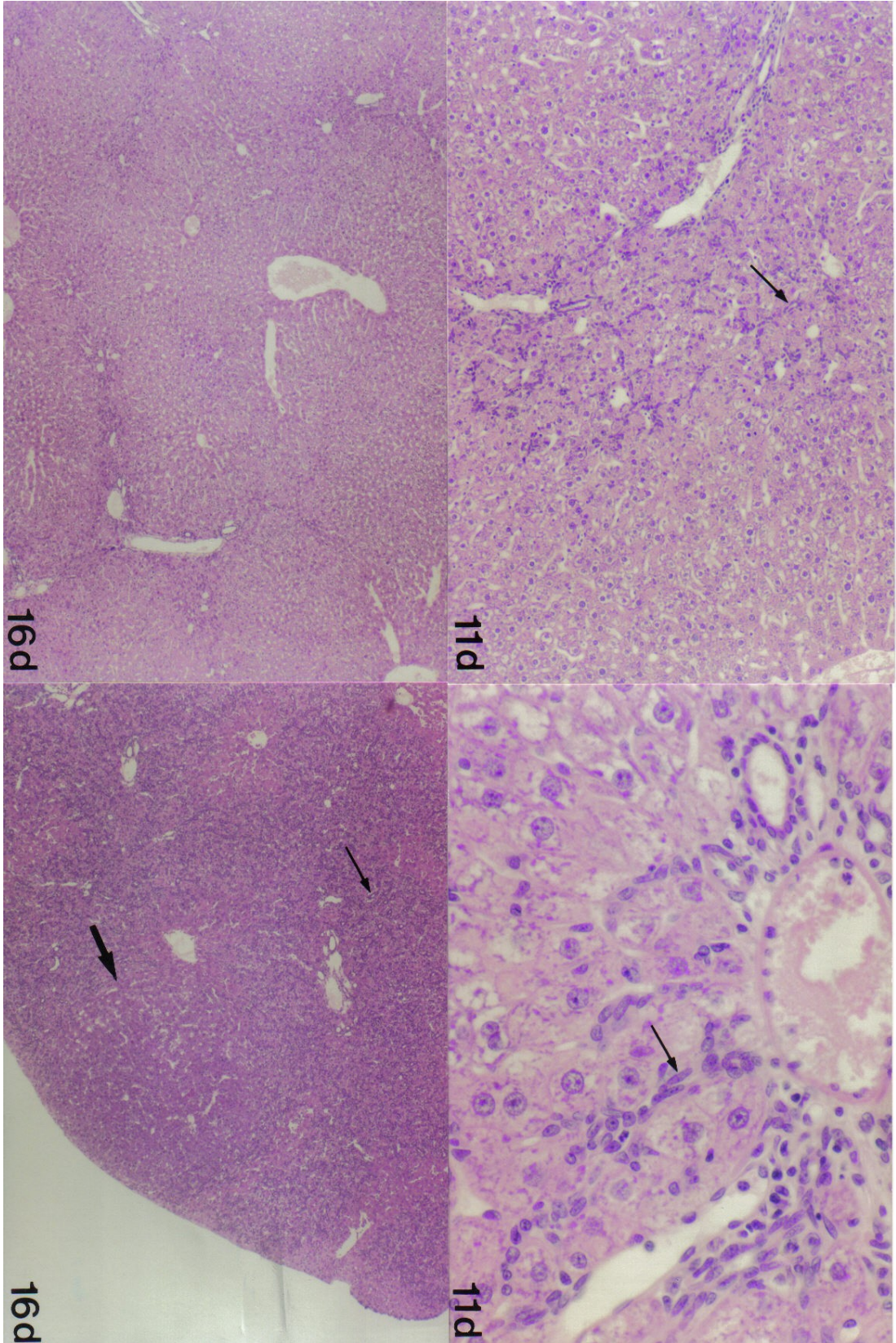
- carcinogenesis in the rat are associated with a decrease in connexin 32 expression. *Carcinogenesis*, London, v.16,n.1,p.101-105,1995.
- VAN POPPEL,G., GOLDBOHM,R.A. Epidemiologic evidence for  $\beta$ -carotene and cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.62,Suppl.6, p. 1393S-1402S, 1995.
- VAN VLIET,T. Absorption of  $\beta$ -carotene and other carotenoids in humans and animal models. *Eur. J. Clin. Nutr.*, London, v.50, Suppl.3, p. 32S-37S, 1996.
- WANG,X.-D. Review: absorption and metabolism of  $\beta$ -carotene. *J. Am. Coll. Nutr.*, New York, v.13, n.4,p.314-325, 1994.
- WANG, X.-D., TANG, G.-W., FOX, J.G., KRINSKY, N.I., RUSSELL, R.M. Enzymatic conversion of  $\beta$ -carotene into  $\beta$ -apo-carotenals and retinoids by human,monkey,ferret,and rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v.285,n.1,p.8-16,1991.
- WEIBEL,E.R. Principles and methods for morphometric study of the lung and others organs. *Lab Invest.*, Washington, v.12,n.2,p.131-155,1963.
- WILGENBUS, K.K., KIRKPATRICK, C.J., KNUECHEL, R., WILLECKE, K., TRAUB,O. Expression of cx 26, cx 32 e cx 43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int. J. Cancer*, Geneva, v.51,n.4,p. 522-529,1992.
- WILLE JR.,J.J., SCOTT,R.E. Supression of tumorigenicity by the cell-cycle-dependent control of cellular differentiation and proliferation. *Int. J. Cancer*, Geneva, v.37,n.6,p.875-881,1986.
- YAMASAKI,H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, London, v.11,n.7,p.1051-1058,1990.
- YAMASAKI,H. Role of disrupted gap junctional intercellular communication in detection and characterization of carcinogens. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 365,n.1-3,p.91-105,1996.
- YAMASAKI,H., HOLLSTEIN,M., MESNIL,M., MARTEL,N., AGUELON,A.M. Selective lack of intercellular communication between transformed and nontransformed cells as a common property of chemical and oncogene transformation of BALB/c 3T3 cells. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.47,n. 21,p.5658-5664,1987.

- YAMASAKI,H., KATOH,F. Further evidence for the involvement of gap-junctional intercellular communication in induction and maintenance of transformed foci in BALB/c 3T3 cells. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.48,n.12,p.3490-3495,1988.
- YAMASAKI,H.,KRUTOVSKIKH,V., MESNIL,M., COLUMBANO,A.,TSUDA,H., ITO,N. Gap junctional intercellular communication and cell proliferation during rat liver carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, Washington, v.101 (Suppl.5),p.191-198,1993.
- YAMASAKI,H., MESNIL,M., OMORI,Y., MIRONOV,N., KRUTOVSKIKH,V. Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.333, n.1/2,p.181-188,1995.
- YAMASAKI,H., NAUS,C.C.G. Role of connexin genes in growth control. *Carcinogenesis*, London, v.17,n.6,p.1199-1213,1996.
- YOUNG,D.S. Implementation of SI units for clinical laboratory data : style specifications and conversion tables. *J. Nutr. Biochem.*, New York, v.1, n.11,p.599-613,1990.
- ZHANG,J.-T., NICHOLSON,B.J. Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, cx 26, as deduced from its cDNA. *J. Cell Biol.* , New York, v.109,n.6,p.3391-3401,1989.
- ZHANG,L.-X., COONEY,R.V., BERTRAM,J.S. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemoprevention action. *Carcinogenesis*, London, v.12,n.11,p.2109-2114,1991.
- ZHANG,L.-X., COONEY,R.V., BERTRAM,J.S. Carotenoids up-regulate connexin 43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.52, n.20, p.5707-5712, 1992.
- ZHANG, L.-X., ACEVEDO, P., GUO, H., BERTRAM, J.S. Upregulation of gap junctional communication and connexin 43 expression by carotenoids in human dermal fibroblasts but not in human keratinocytes. *Mol. Carcinog.*, New York,v.12,p.50-58,1995.
- ZHANG,M., THORGEIRSSON,S.S. Modulation of connexins during differentiation of oval cells into hepatocytes. *Exp. Cell Res.*, New York, v.213, n.1,p.37-42,1994.

- ZHANG,Z.Q., ZHANG,W., WANG,N.Q., BANI-YAGHOUB,M., LIN,Z.X., NAUS,C.C.G. Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin 43. *Carcinogenesis*, v.19,n.11, p. 1889-1894,1998.
- ZIEGLER,R.G. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.53, Suppl.1,p.251S-259S, 1991.
- ZIEGLER, R.G., SUBAR, A.F., CRAFT, N.E., URSIN, G., PATTERSON,B.H., GRAUBARD,B.I. Does  $\beta$ -carotene explain why reduced cancer risk is associated with vegetable and fruit intake? *Cancer Res.*, Philadelphia, v. 52,Suppl.7, p.2060S-2066S, 1992.
- ZIEGLER,R.G.,MAYNE,S.T.,SWANSON,C.A. Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes Control*, London,v.7, n.1, p.157-177, 1996a.
- ZIEGLER, R.G., COLAVITO, E.A., HARTGE, P., McADAMS, M.J., SCHOENBERG,J.B.,MASON, T.J., FRAUMENI JR., J.F. Importance of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. *J.Natl. Cancer Inst.*, Bethesda, v.88, n.9, p.612-615, 1996b.

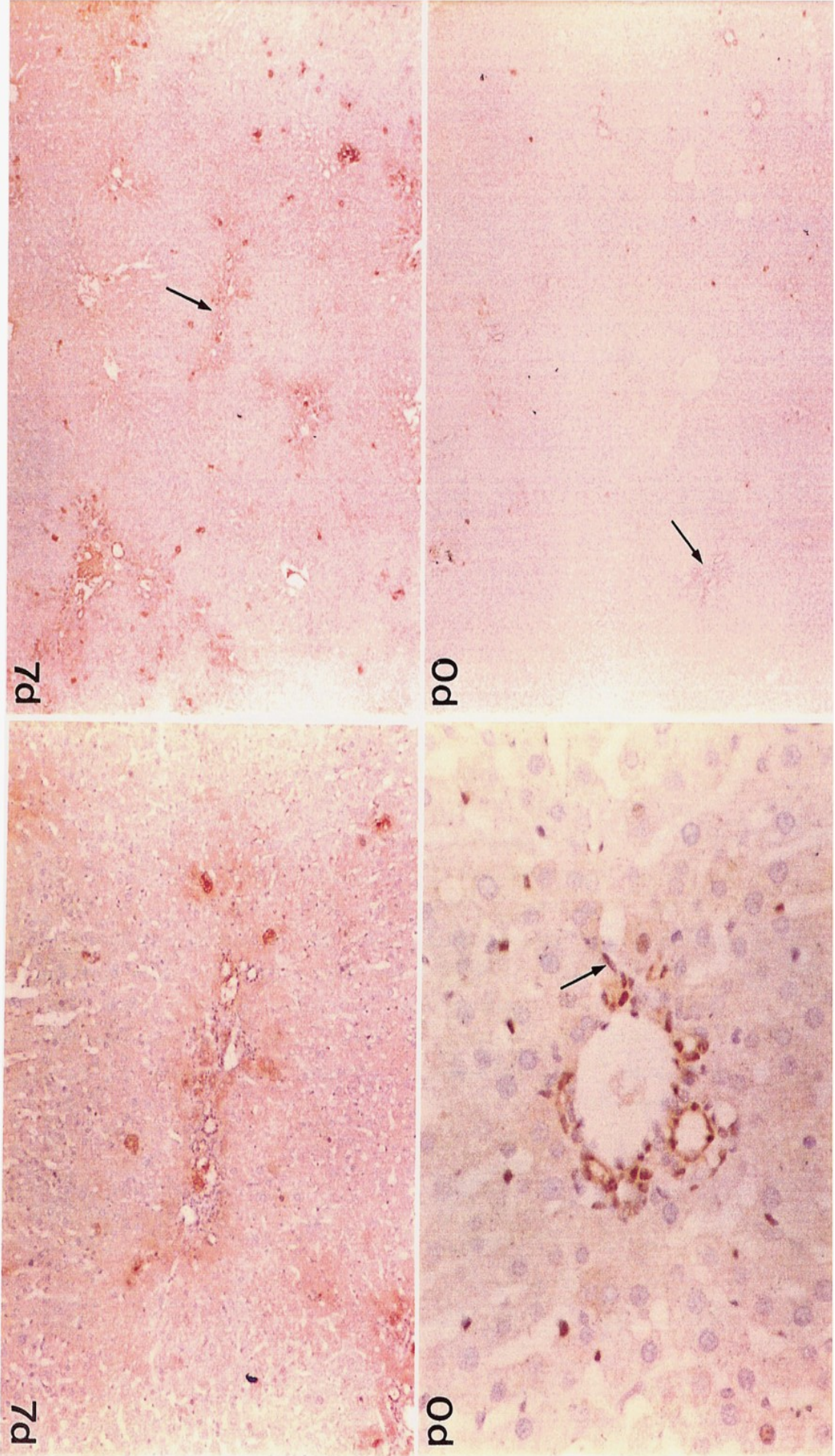
## **ANEXO - ILUSTRAÇÕES**

**FIGURA 8.** Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos tratados com  $\beta$ -caroteno (11d), óleo de milho (16d) e vitamina A (16d'), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial : **11d** = 11° dia pós-hepatectomia – à esquerda, visão panorâmica de regiões periportais contendo alta celularidade (estruturas coradas em tons de lilás mais escuro) invadindo a zona 2 do ácino hepático, e presença de ductos neoformados (seta) (HE,165X), – à direita, detalhe das células ovais (seta) na região periportal (HE,560X); **16d** = 16° dia pós-hepatectomia – visão panorâmica do parênquima hepático com discreta celularidade nas regiões periportais (tons de lilás mais escuro) demarcando os ácinos hepáticos (HE,66X); **16d'** = 16° dia pós-hepatectomia – visão panorâmica do parênquima hepático, evidenciando a presença de ductos neoformados na zona 2 do ácino hepático (seta fina) e de foco de hepatócitos (seta grossa) (HE,66X).

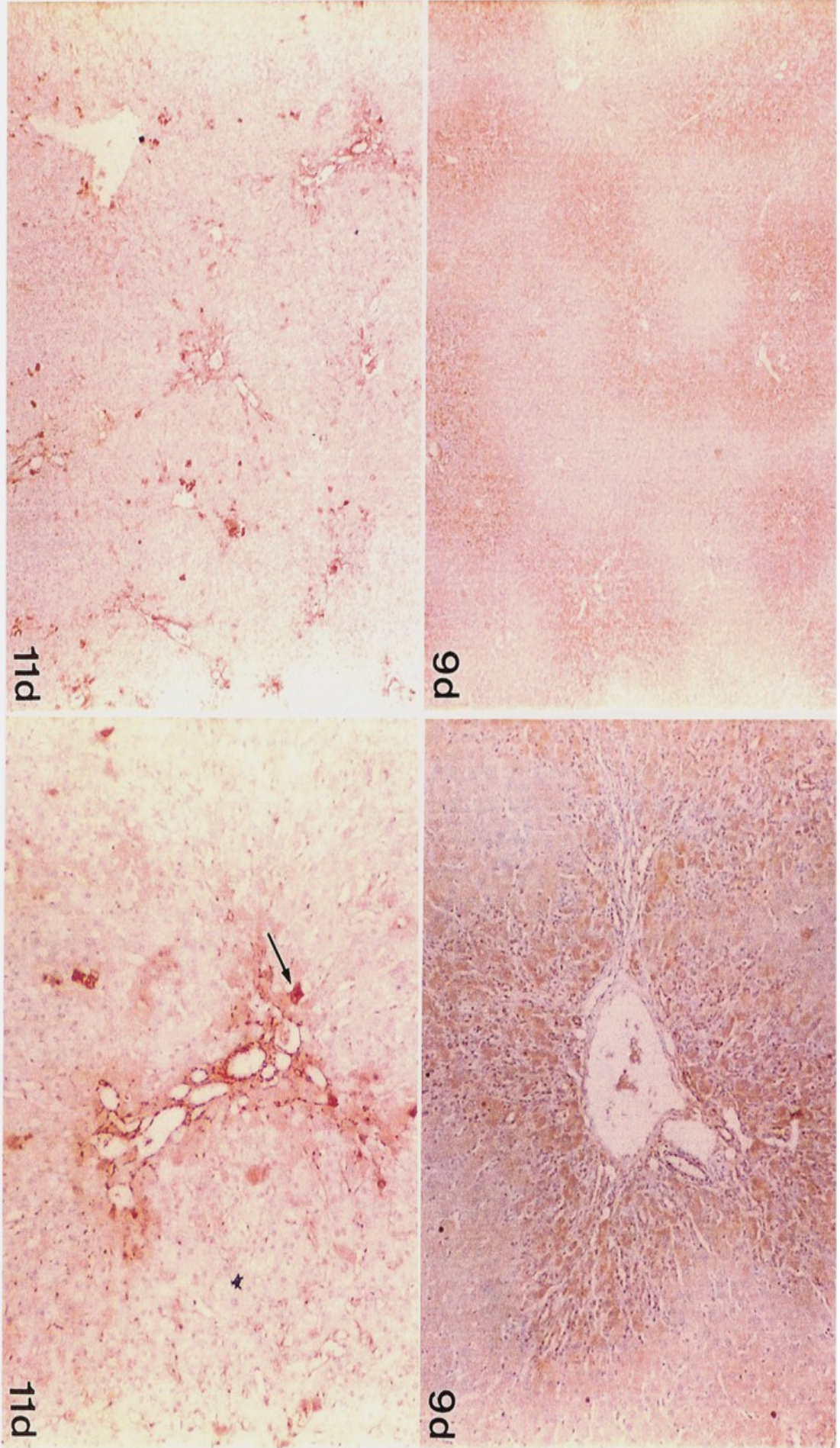




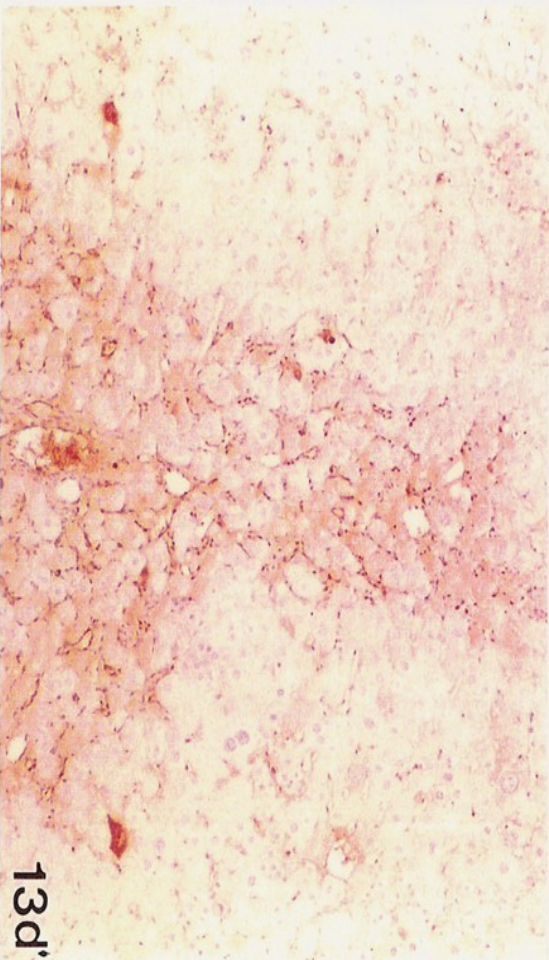
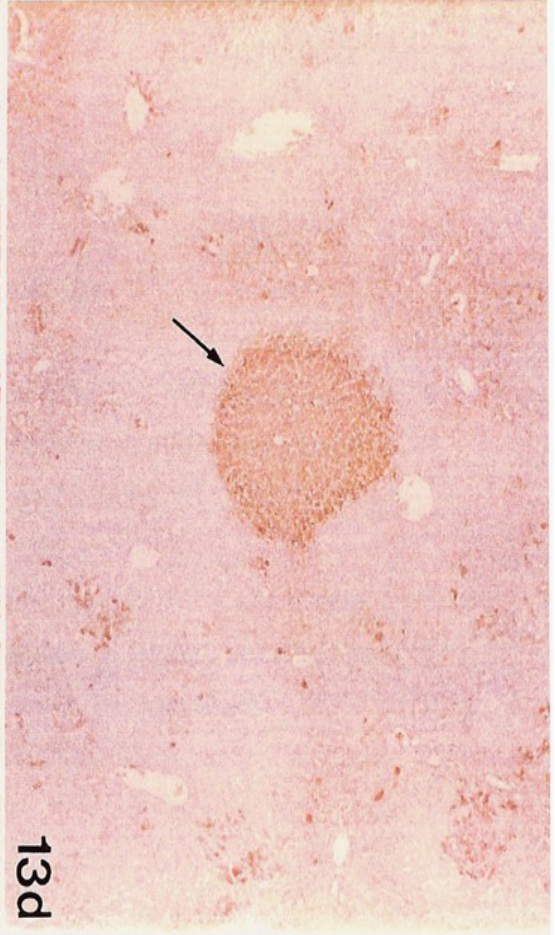
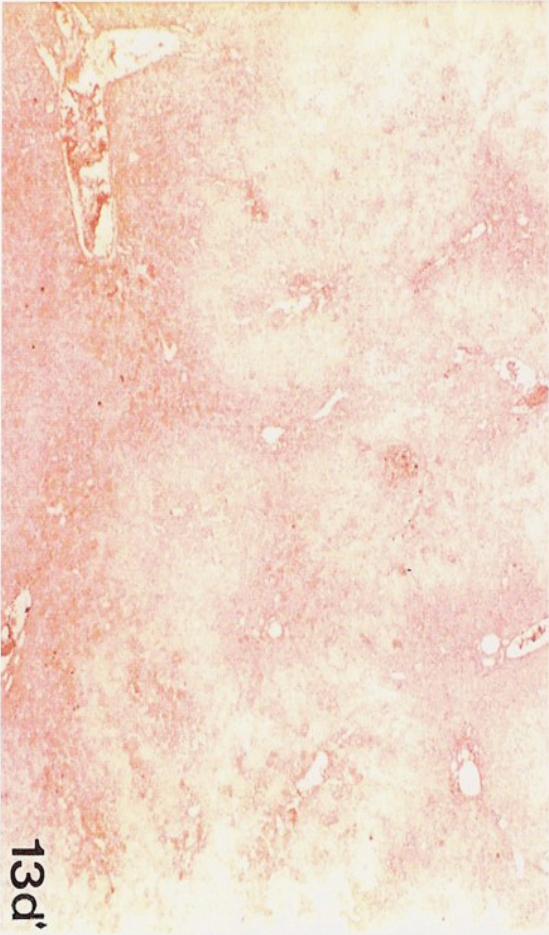
**FIGURA 10.** Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos tratados com óleo de milho (grupo controle), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial: **0d** = tempo zero (à hepatectomia) – à esquerda, visão panorâmica do parênquima hepático evidenciando baixa celularidade nas regiões periportais (seta) (GST-P + hematoxilina, 66X), – à direita, espaço-porta em detalhe, evidenciando células epiteliais biliares (estruturas coradas em tons de castanho mais escuro) e presença ocasional de células ovais (seta) (GST-P + hematoxilina, 560X; **7d** = 7º dia pós-hepatectomia – à esquerda, visão panorâmica do parênquima hepático evidenciando regiões periportais (seta) com celularidade aumentada (GST-P + hematoxilina, 66X), – à direita, visão panorâmica de espaços portais e adjacências (GST-P + hematoxilina, 165X).



**FIGURA 11.** Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos tratados com óleo de milho (grupo controle), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial: **9d** = 9º dia pós-hepatectomia – à esquerda, visão panorâmica do parênquima hepático revelando intensa proliferação de células ovais a partir dos espaços portais, invadindo o parênquima ("manchas" em tons de castanho mais escuro) (GST-P + hematoxilina, 66X), – à direita, detalhe da intensa celularidade (pico de proliferação das células ovais) na região periportal (GST-P + hematoxilina, 165X); **11d** = 11º dia pós-hepatectomia – à esquerda, visão panorâmica do parênquima hepático evidenciando redução na celularidade periportal em relação ao 9d (GST-P + hematoxilina, 66X), – à direita, detalhe de espaços portais e adjacências com celularidade reduzida e presença de hepatócitos marcados (seta) (GST-P + hematoxilina, 165X).



**FIGURA 12.** Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos tratados com óleo de milho (13d e 16d) e  $\beta$ -caroteno (13d'), submetidos ao modelo AAF/PH de diferenciação de células ovais, e sacrificados em diferentes dias após hepatectomia parcial: **13d** e **16d** = 13° e 16° dias pós- hepatectomia – visão panorâmica de parênquimas hepáticos com discreta celularidade nas zonas periportais, evidenciando foco de hepatócitos ( 13d, seta) e a arquitetura acinosa do fígado em 16d (GST-P + hematoxilina,66X); **13d'** = 13° dia pós-hepatectomia – à esquerda, visão panorâmica do parênquima hepático com intensa celularidade nas regiões periportais (coradas em tons de castanho) delimitando os ácinos hepáticos (GST-P + hematoxilina, 66X), – à direita, detalhe da proliferação de células ovais (coradas em tons de castanho mais escuro), a partir da região periportal, invadindo o parênquima (GST-P + hematoxilina,165X).



## SUMMARY

### BETA-CAROTENE AND VITAMIN A MODULATE THE OVAL CELLS PROLIFERATION AND THE CONNEXIN 43 GENE EXPRESSION AT *IN VIVO* HEPATIC CELLULAR DIFFERENTIATION MODEL

The aim of this work was to investigate the  $\beta$ -carotene and vitamin A effects in the process of oval cells proliferation at hepatic cellular differentiation model. Wistar male rats were treated with  $\beta$ -carotene (BC group – 70 mg/kg body wt), vitamin A (VA group – 10 mg/kg body wt) or corn oil (CO – control group) administrated by gavage, on alternate days, during 4 consecutive weeks. Since, the animals were submitted to a AAF/PH model (6 x 20 mg AAF [2-acetylaminofluorene] / kg body wt and partial hepatectomy – PH) and sacrificed at different days after PH. Liver samples were picked for analysing  $\beta$ -carotene, retinol and retinyl palmitate concentration (by HPLC); for histology (HE) and immunohistochemistry (with antibody anti-GST-P), and for evaluating connexins 43 and 32 gene expression (by northern blot). Histological and immunohistochemical analysis showed that the oval cells proliferation peak was delayed to the late days after PH, by similar way in the BC and VA groups, when compared with control group. Northern blot evaluation revealed that the cx 43 gene expression was also delayed to the late days after PH, by analogue way in the BC and VA groups, and vitamin A enhanced cx 43 gene expression in the late days after PH. Connexin 32 gene expression did not change among the experimental groups. Thereby, the  $\beta$ -carotene and vitamin A delayed the oval cells proliferation and the cx 43 gene expression. Moreover,  $\beta$ -carotene showed a tendency to induce the oval cells differentiation to hepatocytes.