

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NO
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS
QUIMICAMENTE INDUZIDAS EM RATOS WISTAR MACHO.

MARIANA BAPTISTA TABLAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIA DE BOTUCATU

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NO
DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS
QUIMICAMENTE INDUZIDAS EM RATOS WISTAR MACHO.

MARIANA BAPTISTA TABLAS

LUÍS FERNANDO BARBISAN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Tablas, Mariana Baptista.

Efeito da suplementação de vitamina D no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas quimicamente induzidas em ratos Wistar macho / Mariana Baptista Tablas. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luís Fernando Barbisan

Capes: 20603002

1. Fígado - Câncer. 2. Câncer - Quimioprevenção. 3. Vitamina D. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Fígado; Lesão pré-neoplásica; Quimioprevenção; Vitamina D.

Agradecimentos

Agradeço todos os meus dias pelas pessoas especiais que me conduziram a este caminho, que me escolheram e acreditaram no meu potencial.

Inicialmente dedico este espaço para o Prof. Dr. Carlos Eduardo Andrade Chagas que me abriu as portas para a vida Acadêmica e me mostrou a importância e a beleza de fazer parte deste mundo e como é importante atualizar e adquirir mais conhecimento para o crescimento profissional e pessoal.

Além disso, agradeço eternamente ao meu ex-coorientador que por destino tornou-se meu querido orientador o Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan que me acolheu nos momentos mais difíceis e me deu oportunidade de continuar este trabalho.

Ao departamento de Morfologia e ao Laboratório LCQE (Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental) por me receber de braços abertos.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro que foi fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa, processo número 2012/03964-8 e auxílio pesquisa número 2012/03628-8.

E nada disso poderia ter acontecido se não tivesse o apoio da minha família principalmente dos meus pais Paulo Fernando Corrêa Tablas e Nancy Baptista Ferreira Tablas que sempre apoiam as minhas decisões, acreditam no meu potencial e sabem que luto a cada dia para ser cada vez melhor.

Ao meu companheiro, amigo e conselheiro Gilberto Magalhães Filho que me acompanhou por estes dois anos de jornada.

E aos amigos e colegas de trabalho por completar cada espaço deste meu mundo acadêmico.

Obrigada.

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	2
1-Introdução.....	3
1.1 Câncer, Vitamina D e Doenças Hepáticas.....	3
1.2 Metabolismo da Vitamina D.....	5
1.3 Hepatocarcinogênese e modelos experimentais.....	9
1.4 Objetivo Geral.....	13
1.4.1 Objetivos Específicos.....	13
2-Material e Métodos.....	14
2.1 Animais e Ambiente de Experimentação.....	14
2.2 Delineamento.....	14
2.3 Análises Bioquímicas (ALT, AST, Vitamina D circulante (25OHD) e Calcitriol (1,25OHD).....	16
2.4 Análises Microscópicas.....	16
2.4.1 Imunohistoquímica para a enzima glutathione S-transferase, forma placentária (GST-P) e Ki-67.....	17
2.5 <i>Western Blotting</i> para VDR e β – actina.....	18
2.6 Análise Estatística.....	18
3- Resultados.....	19
4- Discussão.....	28
6- Referências.....	31

Resumo

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o quinto mais frequente na população humana comum e o terceiro em mortalidade no mundo, evidenciando a necessidade de modelos biológicos para avaliação de fatores de risco, prevenção e tratamento desta malignidade. Existem vários modelos experimentais para o estudo da hepatocarcinogênese que utilizam substâncias químicas como a dietinitrosamina (DEN), agente iniciador da carcinogênese, e o tetracloreto de carbono (CCl_4), agente promotor. Vários tipos celulares têm a capacidade de sintetizar/metabolizar e/ou serem estimuladas pela vitamina D (VD), incluindo as células hepáticas. Com isso, existe interesse em associar a deficiência de VD ao desenvolvimento de doenças hepáticas, incluindo o CHC. Desta forma, o presente estudo foi conduzido para avaliar o efeito da suplementação com VD3 (VD circulante) sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas (LPN) induzidas no modelo DEN/ CCl_4 em ratos Wistar. Os animais foram randomicamente alocados em seis grupos experimentais (n=15/grupo): G1: animais não tratados, G2: animais iniciados com dose única intraperitoneal (i.p.) de 200 mg/kg de DEN e aplicações intragástricas (i.g.) semanais de 1,0 ml/kg de CCl_4 até o final da 18ª semana do experimento; G3 a G6: os animais foram submetidos ao protocolo DEN/ CCl_4 e receberam em dias alternados doses i.g. de 250, 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g/kg}$ de VD3, respectivamente, durante dezesseis semanas. No final da 18ª semana do experimento, os animais foram eutanaziados e o sangue (dosagens séricas de AST e 25OHD) e fígado (detecção de LPN glutathione S-transferase positivas (GST-P+), hepatócitos Ki-67 positivos e expressão protéica do receptor da VD (VDR)) foram analisados. Os grupos que receberam as doses de 1000 e 1500 $\mu\text{g/kg}$ de VD3 apresentaram menor evolução de peso corpóreo e ingestão de ração ($p < 0,001$) e maiores valores de peso hepático relativo e de níveis séricos de 25OHD ($p < 0,001$) quando comparado aos grupos G1 e G2. O número total de LPN GST-P+ por área hepática (mm^2) não diferiu entre os grupos iniciados, mas o número médio de LPN positivas para a GST-P $> 1,0$ mm foi menor ($p < 0,001$) nos grupos G3 a G6 quando comparado com o grupo G2, sem um efeito dose-resposta evidente. Além disso, os níveis de proliferação celular no fígado foram menores ($p < 0,001$) nos grupos G4 e G5 quando comparado ao grupo G2, mas sem aumento significativo dos níveis de expressão protéica do VDR. A VD3 em doses mais elevadas de 1000 e 1500 $\mu\text{g/kg}$ apresentou efeitos preventivos contra o desenvolvimento de LPN GSTP+ no modelo DEN/ CCl_4 utilizado neste estudo.

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most frequent cancer worldwide, ranking third among all cancer-related mortalities in the world, indicating the importance to development of bioassays for evaluation of risk factors, prevention and treatment this malignancy. There are several animal models for the study of hepatocarcinogenesis using chemicals such as diethylnitrosamine (DEN), as an initiator for carcinogenesis, and carbon tetrachloride (CCl₄) as a promoting agent. Various cell types have the capacity to synthesize/metabolize and/or it are stimulated by vitamin D (VD), including hepatocytes. Thus, there is a crescent evidence for relationship between VD deficiency and the development of liver disease, including HCC. Therefore, this study was conducted to evaluate the beneficial effect of VD₃ supplementation on development of preneoplastic lesions (PNL) in the DEN/CCl₄ model. Male Wistar rats were randomly divided into six groups (15 animals each). G1: untreated control group; G2-G6: groups received a single i.p. dose of diethylnitrosamine (DEN) and weekly intragastric administrations (i.g.) of carbon tetrachloride (CCl₄); G3-G6: groups were submitted to DEN/CCl₄ protocol and received VD₃ supplementation at doses of 250, 500, 1000 and 1500 µg/kg, i.g., respectively, on alternate days for 16 weeks. At the end of week 18, the animals were euthanized and blood (AST and VD₃ serum levels analysis) and liver (placental glutathione S-transferase (GST-P)-positive PNL, KI-67 cell proliferation and vitamin D receptor (VDR) analysis) samples were collected. Groups receiving 1000 and 1500 µg/kg vitamin D₃ presented significantly lower mean body weight evolution and food intake ($p < 0,001$) but a increase ($p < 0,001$, $p < 0,001$) in relative liver weight and VD₃ serum levels in relation to groups G1 and G2. The total number of GST-P-positive LPN per area (mm²) did not differ between the DEN-initiated groups, but the mean number of larger GST-P-positive PNL ($> 1,0$ mm) was significantly lower ($p < 0,001$) in the groups G3 to G6 when compared to the group G2, without a clear dose-response. In addition, the hepatic cell proliferation levels (Ki-67) were significantly lower in groups G5 and G6 when compared to the groups G1 and G2, but without an increase in VDR protein levels. High doses of VD₃ supplementation (1000 and 1500 µg/kg) has beneficial effects against GST-P-positive PNL and cell proliferation induced in the DEN/CCl₄ model used.

1- Introdução

1.5 Câncer, Vitamina D e Doenças Hepáticas.

O câncer é considerado um importante problema de saúde pública em diversos países, incluindo o Brasil (THUN et al., 2010; INCA 2012). Nesse sentido, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (*International Agency for Research on Cancer* (IARC), estimou para 2012 cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes em comparação com 12,7 milhões de casos e 7,5 milhões de mortes em 2008. A partir de dos dados dessa projeção, a GLOBOCAN 2012 estima um aumento substancial de 19,3 milhões de novos casos de câncer por ano até 2025, devido ao crescimento e envelhecimento global da população. Mais da metade de todos os cânceres (56,8%) e mortes por câncer (64,9%) em 2012 ocorreu em regiões do mundo menos desenvolvidas, e essas proporções irão aumentar ainda mais até 2025 (IARC, 2012).

Mundialmente o câncer mais diagnosticado é o de pulmão (1,8 milhões), mama (1,7 milhões), colorretal (1,4 milhões). E casos de morte mais comum por câncer são os de pulmão (1,6 milhões), fígado (0,8 milhões) e estômago (0,7 milhões) (IARC, 2012). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimou para 2014 cerca de 576.580 novos casos de câncer (INCA, 2012). O carcinoma hepatocelular (*hepatocellular carcinoma* (HCC)) é diagnosticado em mais de meio milhão de pessoas em todo o mundo, incluindo cerca de 20.000 novos casos nos Estados Unidos, sendo o quinto mais comum em homens e o sétimo em mulheres (EL-SERAG, 2011). Atualmente é considerado o terceiro câncer com maior mortalidade global (DING; WANG, 2013).

Os principais fatores de risco do HCC são as infecções por vírus da hepatite B (HVB) ou hepatite C (HVC), esteatose hepática alcoólica em decorrência do abuso de consumo de álcool, esteatose hepática não alcoólica (*non-alcoholic fatty liver disease* ou NAFLD) caracterizada inicialmente pelo acúmulo de gotículas de gordura nos hepatócitos que pode progredir para uma esteatohepatite não alcoólica (*nonalcoholic steatohepatitis* ou NASH) (MISRA; REDDY, 2013). A maioria destes fatores de risco leva a hepatite crônica e cirrose, presente em 80-90% dos pacientes com HCC (FORNER, 2012, DING; WANG, 2013). A distribuição dos fatores de risco da HCC é variável, pois depende da região geográfica, raça e grupo étnico (EL-SERAG, 2011). No Leste da Ásia e a África Subsaariana, responsáveis por 80% dos casos de HCC, os principais fatores de risco são a infecção pelo HVB juntamente

com a exposição à aflatoxina B1, produzida por um fungo *Aspergillus flavus* presente em grãos como arroz, milho e amêndoas (ASHAM et al., 2013). Na América do Norte, Europa e Japão, infecção por HVC é o principal fator de risco, juntamente com as tendências do consumo de álcool (FORNER, 2012). Mas a presença da fibrose é um elo comum entre cada um destes riscos (ZHANG; FRIEDMAN, 2012).

A fibrose hepática (FH) é uma consequência das doenças hepáticas crônicas, pois ela é responsável pela deposição de tecido fibrótico, rompendo a arquitetura hepática e levando à insuficiência hepática e cirrose (FIRRINCIELI et al., 2013). A FH é caracterizada pela ativação de células não parenquimatosas do fígado e deposições excessivas de matriz extracelular (MEC), incluindo os colágenos tipo I e III. As duas principais células que estão envolvidas no processo fibrótico são as células estreladas hepáticas (CEH) e as células mesenquimais (FIRRINCIELI et al., 2013). O processo fibrótico é orquestrado pelas CEH que se tornam ativas, perdendo seu conteúdo retinóide, transformando-se em células miofibroblásticas que são responsáveis pela deposição de MEC no fígado fibrótico (ZHANG; FRIEDMAN, 2012). Dois fatores de crescimento são responsáveis pela ativação das CEH, o fator de crescimento derivado de plaqueta (*proliferative platelet derived growth factor* ou PDGF) e o fator de crescimento e transformação beta (*transforming growth factor-beta* ou TGF- β), além de citocinas que regulam a fibrogênese e a sinalização inflamatória pelas células imunológicas infiltradas (JEONG et al., 2012). Estes componentes depositados no fígado são tentativas de reparar o tecido hepático na fase crônica. Na fase aguda a mudança da arquitetura hepática é reversível, diferente da fase crônica como no caso da cirrose onde ocorre à substituição progressiva do parênquima hepático pelo tecido cicatricial (LEE et al., 2011).

As opções terapêuticas para o HCC são limitadas e frequentemente ocorrem recidivas, sendo a ressecção hepática considerada a modalidade de tratamento mais indicada em alguns casos (10–20% dos pacientes) visto que depende de fatores como o tamanho do tumor, multifocalidade, invasão vascular ou descompensação hepática (BISHAYEE et al., 2010). Embora o transplante hepático parece ter sucesso para o tratamento do HCC em estágios iniciais, um pequeno número de pacientes são candidatos para esta opção (BISHAYEE et al., 2010). Novas drogas quimioterápicas como interferon, interleucina-2 e tamoxifeno tem sido utilizadas com certa eficácia para o tratamento de pacientes com HCC (CHIANG et al., 2011). Um novo medicamento, a sorafenibe, que atua na inibição da proliferação celular,

angiogênese e indução de apoptose, foi aprovado nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do HCC, mas efeitos adversos graves tem sido descritos como reações e erupção cutâneas, hipertensão, fadiga, diarreia, dispepsia e hemorragias (BISHAYEE et al., 2010, BROSE et al., 2014). Apesar dos avanços recentes conduzirem para uma melhoria da sobrevida dos pacientes com HCC, os resultados com os tratamentos convencionais, no entanto, não são ainda satisfatórios (NONAKA et al., 2010, CHIANG et al., 2011).

Com isso, a quimioprevenção foi considerada uma das melhores estratégias para reduzir o atual quadro de morbidade e mortalidade associada ao HCC. (BISHAYEE et al., 2010). A principal característica dos agentes quimiopreventivos é a possibilidade de reverter, suprimir ou retardar a fase inicial da carcinogênese ou a evolução das células neoplásicas através da utilização de agentes naturais, sintéticos ou biológicos (BONOVAS et al. 2008, UMAR et al., 2012). Existem três estratégias para se utilizar a quimioprevenção, a primeira delas envolve intervenções destinadas a ajudar indivíduos saudáveis a impedir o desenvolvimento de algum tipo de neoplasias, o segundo é fornecer tratamento com o objetivo de evitar a progressão do câncer e a terceira seria auxiliar pacientes com uma história de tratamento do câncer, a evitar o surgimento de uma segunda neoplasia (BONOVAS et al. 2008).

Entre os potenciais agentes quimiopreventivos encontramos as vitaminas, entre elas a vitamina D (BISHAYEE et al., 2010). Vários trabalhos recentes mostram que a vitamina D, em especial a deficiência, está associada ao desenvolvimento de várias doenças hepáticas (KASAPOGLU et al., 2013) . A hipótese de que a VD poderia fornecer benefícios na diminuição do risco de desenvolvimento do câncer foi reconhecido a partir de estudos epidemiológicos décadas atrás, no qual relataram a associação entre a latitude e mortalidade do câncer com base na exposição ao sol (KRICKER; ARMSTRONG, 2006, MARSHALL et al., 2012).

De acordo com Krishnam; Feldman (2011), o aumento nas taxas de incidência e de mortalidade nos diferentes tipos de câncer está presentes nas regiões geográficas ou em populações menos expostas a radiação ultravioleta B (UV-B). Por outro lado, o potencial anticancerígeno é beneficiado em regiões com alta exposição à luz solar visto que a luz UV é essencial para a síntese cutânea da vitamina D (VD) (KRISHNAN; FELDMAN, 2011). A

hipótese do efeito benéfico da luz do sol, tem sido proposto para vários tipos de cânceres, incluindo colorretal câncer (CaC), câncer de próstata (CaP) e câncer de mama (CaM). Alguns estudos relatam uma associação inversa entre o risco de câncer e os níveis de VD circulante (25OHD), que refletem tanto na ingestão de fontes dietéticas de VD como na exposição ao sol (KRISHNAN; FELDMAN, 2011). Observou-se também em estudos epidemiológicos que 50% dos pacientes com HVC apresentaram deficiência moderada de VD e 30% apresentavam deficiência severa. A deficiência de VD foi ainda mais frequente nos indivíduos cirróticos (30%) em comparação aos não-cirróticos (14%) (ARTEH et al., 2010). Em outro estudo, observou-se que 85% dos pacientes com cirrose alcoólica apresentaram deficiência de VD e que a concentração desta vitamina foi ainda menor com o avanço da doença (MALHAM et al., 2011).

1.2. Metabolismo da Vitamina D

A VD ou calciferol é uma molécula lipossolúvel derivada do colesterol, pertencente à família dos hormônios esteroides (DIXON; MASON, 2009). Existem duas formas de VD, a VD₃ (colecalfiferol) produzida na pele pela exposição ao sol ou por meio de alimentos e a VD₂ (ergosterol) obtida apenas por alimentos (JONES, 2013).

A quantidade de alimentos naturais que contém VD₃ é muito limitada, entre eles os óleos de peixe como salmão, sardinha e tuna e óleo de fígado de bacalhau (peixes especialmente gordurosos) e a VD₂ é obtida pela ingestão de alimentos de origem vegetal como plantas e cogumelos (WACKER; HOLICK, 2013).

A VD é essencial para a formação e desenvolvimento ósseo e manutenção da homeostase do cálcio e fósforo e também participa ativamente do metabolismo do hormônio da paratireóide (DIXON; MASON, 2009; ZÚÑIGA et al., 2011). Quando convertida pela luz solar ou pela alimentação, ela é armazenada no tecido adiposo para uso futuro e a outra parte é incorporado na fração dos quilomícrons e transportado do sistema linfático para a circulação venosa (SHAPSES et al., 2013; WACKER; HOLICK, 2013).

Uma vez formado a VD₃ na pele ou obtida pela dieta, ela é transportada para fora da membrana plasmática para o espaço extracelular, no qual é arrastada para o leito capilar cutâneo pela glicoproteína ou proteína ligadora da VD (*Vitamin D binding protein (DBP)*) uma proteína multifuncional encontrada no plasma e na superfície de muitos tipos celulares.

No plasma, a DBP se liga a VD e seus metabólitos e o complexo é transportado para o fígado para a metabolização e formação da 25OHD (25OHD₂ ou 25OHD₃) ou VD circulante (HOLICK et al., 2007). Em geral o transporte extracelular de todos os metabólitos da VD é processado pela DBP (BAEKE et al., 2008). A VD sofre duas alterações bioquímicas sequenciais envolvendo a adição de dois grupos hidroxila (DIXON et al., 2009). A primeira destas reações ocorre no fígado onde a VD sofre hidroxilação no carbono 25 pela ação da enzima CYP27A1, pertencente à família do citocromo P450, resultando na forma circulante da VD a 25OHD, conhecida como VD circulante ou pró-hormônio, em seguida a 25OHD é metabolizada pelo rim pela ação da enzima CYP27B1, formando a 1,25-dihidroxitamina D (1,25OHD) conhecida como VD ativa ou hormônio secoesteróide (Figura 1) (EBERT et al., 2006; CHAGAS et al., 2012) (Figura 1).

A VD também apresenta algumas funções adicionais como efeito antifibrótico, pró-diferenciação, pró-apoptótico, anti-angiogênico e anti-invasivo (CHIANG, et al., 2011). A VD ativa é mediada pelo receptor de VD o VDR que regula a expressão de genes nos tecidos-alvos (CHIANG, et al., 2011). O VDR é um membro da superfamília de receptores nucleares que participa das ações biológicas da VD, regulando a expressão de vários genes envolvidos na homeostase do cálcio e fosfato, proliferação celular e diferenciação e na resposta imunológica (WANG et al., 2012). Esse receptor está presente em vários tecidos do organismo, indicando que eles são alvo da ação da VD, a VDR é amplamente distribuída ao longo do intestino, no rim, nas células β pancreáticas, tireoide, pele, ossos, pulmão, sistema imunológico e com baixa expressão no fígado (SCHUSTER, 2011).

A 1,25 OHD se liga com especificidade na parte hidrofóbica da VDR, induzindo uma mudança conformacional no receptor e permitindo a formação do complexo transcricional hormônio-receptor (1,25OHD-VDR) (CHRISTAKOS et al., 2013). Esse complexo é heterodimerizado com o RXR (retinóide X receptor) e esse heterodímero 1,25(OH)D-VDR-RXR acopla-se a uma sequência específica do DNA nos seus genes-alvos, denominada VDRE (*vitamin D response element*) ou elemento de resposta da VD, em seguida o heterodímero recruta complexos de proteínas corregulatórias (SCHUSTER, 2011). Essas moléculas corregulatórias são a coativadoras (CoA) e as co-repressoras (CoR). A CoA tem a capacidade de construir uma ponte para a maquinaria transcricional basal que é montada sobre o sítio iniciador de transcrição (SIT) que estimulará a transcrição do gene alvo e as CoRs que participam da transrepressão que é um processo de transcrição onde ocorre a repressão do gene-alvo (CARLBERG; CAMPBELL, 2013).

A regulação da expressão gênica da 1,25OHD depende da capacidade do heterodímero VDR-RXR em recrutar complexos de proteínas corregulatórias que podem ativar ou reprimir a expressão do gene-alvo (CAMPBELL et al., 2010). Com isso, permitindo a ligação entre o receptor e a maquinaria de transcrição do RNAm hormônio-específico que regula a tradução de diversas proteínas (WACKER; HOLICK, 2013) (Figura 2).

Figura 1: Metabolismo da Vitamina D. Imagem Modificada (MATTHEW; ROBERTS, 2012).

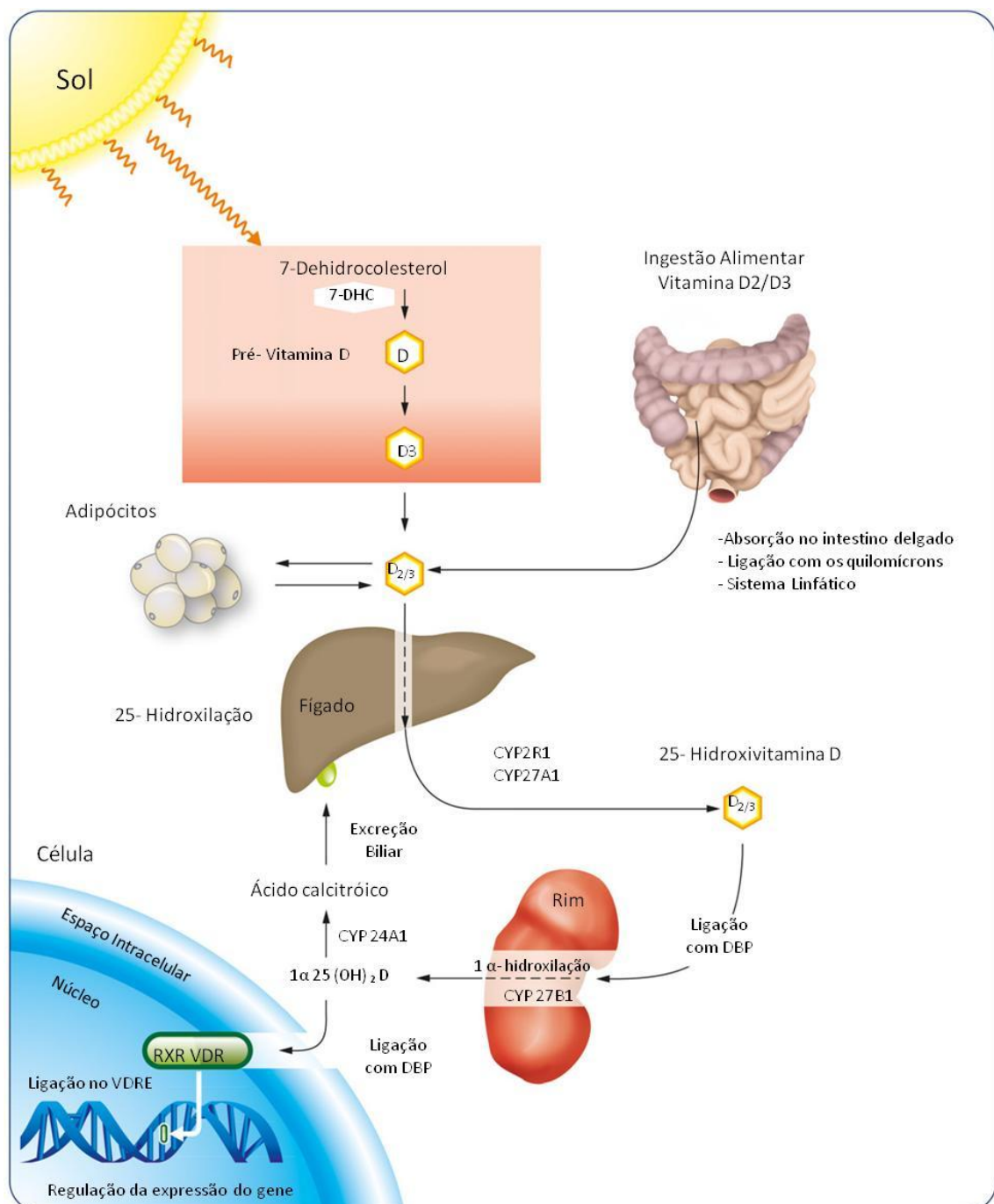
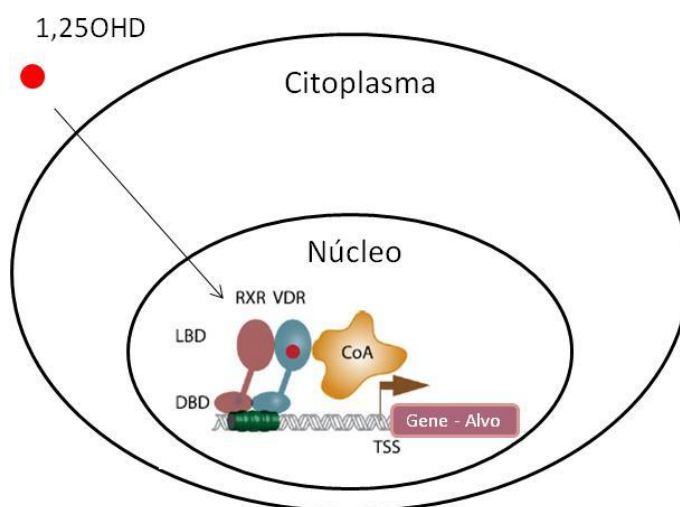


Figura 2: Ilustração do sítio de ligação do VDR e transcrição do gene - alvo. Imagem modificada (YANG et al., 2012; CARLBERG; CAMPBELL, 2013).



CoA: Coativador responsável pela transcrição; LBD: Domínio de ligação do DNA; DBD: Domínio de ligação do ligante; TSS: Sítio Iniciador da transcrição.

1.3. Hepatocarcinogênese e modelos experimentais

O processo de carcinogênese química em roedores é complexo e evolui através de múltiplas etapas denominadas de iniciação, promoção e progressão (PITOT, 2001, 2007). Entende-se por iniciação a interação irreversível de um agente químico com o DNA da célula-alvo, levando a alterações permanentes na estrutura do DNA tais como ligações covalentes, distorção ou quebra da molécula em fita simples ou dupla (PITOT, 2001, 2007). Se as células com danos no DNA não sofrerem a ação do sistema de reparo do DNA e/ou forem eliminadas por apoptose, estas formarão as chamadas células iniciadas. A promoção é caracterizada pela expansão clonal de células iniciadas levando ao aparecimento das lesões pré-neoplásicas (PITOT, 2001, 2007), que apresentam importantes modificações em níveis morfológicos e moleculares, incluindo aquelas em genes que controlam a proliferação, diferenciação e apoptose celular (PITOT, 2001, 2007). Quando as lesões adquirem características de malignidade tem-se a fase de progressão, na qual são observadas inúmeras alterações genotípicas, relacionadas à proliferação celular/apoptose, invasividade, capacidade metastática, fornecendo substrato biológico para a manifestação clínica do câncer (PITOT 2001, 2007).

Os modelos experimentais de hepatocarcinogênese química em roedores são desenvolvidos com dois objetivos gerais: 1) o estudo da biologia ou evolução do desenvolvimento do HCC (NEWELL et al., 2008; WU et al., 2009; HEINDRYCKX et al., 2009) ou para a detecção do potencial carcinogênico ou anticarcinogênico de substâncias químicas (MOORE et al., 1996; SAKAI et al., 2002; ITO et al., 2003; ITTRICH et al., 2003). O câncer hepático induzido quimicamente em roedores ocorre através do desenvolvimento de alterações morfológicas sequenciais caracterizadas inicialmente por focos de hepatócitos alterados (lesões pré-neoplásicas, LPN), seguido pelo desenvolvimento de adenomas e de HCC (BANNASCH; ZERBAN, 1992; HASEGAWA; ITO, 1992, ATERMAN, 1995). A demonstração de que estas alterações estão sequencialmente associadas indica que as LPN representam lesões pré-neoplásicas, podendo ser considerados marcadores histológicos da futura neoplasia hepática em ratos e humanos (SU et al., 1997; BANNASCH et al., 2003, SU; BANNASCH, 2003).

Diferentes tipos de LPN têm sido identificados no fígado de ratos, na dependência das alterações de seus componentes citoplasmáticos, como glicogênio, retículo endoplasmático, ribossomos e peroxissomos (BANNASCH; ZERBAN, 1992; BANNASCH et al., 2003). Sob coloração de rotina (HE), as alterações do citoplasma permitem classificar as LPN em: focos de células claras, focos de células acidofílicas, focos de células intermediárias, focos de células anfófilas, focos de células xenomórficas, focos de células tigróides, focos de células basofílicas e focos de células mistas. As LPN mais comuns observados nos modelos de hepatocarcinogênese química são os focos de células claras, eosinofílicas e basofílicas (BANNASCH et al., 2001).

A demonstração de que os hepatócitos das LPN exibem atividade enzimática diferente dos hepatócitos normais permite detectá-las imuno e histoquimicamente através de marcadores enzimáticos como gama-glutamyltranspeptidase (GGT), adenosintrifosfatase (ATPase), glicose-6 fosfatase (G-6-Pase) e glutathione S-transferase, forma placentária (GST-P) (BANNASCH et al., 2003). Esta última é reconhecida como um dos melhores marcadores de focos de hepatócitos alterados em estudos de hepatocarcinogênese (TSUDA et al., 2003, BANNASCH et al., 2003).

A expressão da GST-P é normalmente baixa em hepatócitos fetais, adultos quiescentes ou em regeneração, placenta, coração e outros órgãos de ratos machos, mas significativamente elevada nos rins e pâncreas (SATO et al., 1985). Nódulos hiperplásicos e tumores hepáticos, induzidos em ratos pela utilização do modelo de Solt e Faber (1976), apresentam conteúdos de GST-P cerca de 20 a 50 vezes e de 10 a 30 vezes, respectivamente, quando comparados aos

valores de fígados normais (cerca de $34 \pm 9,4$ $\mu\text{g/g}$ de tecido) (SATO et al., 1985, SOMA et al., 1986). Esses níveis são acompanhados pelo aumento da expressão do mRNA da GST-P em nódulos hiperplásicos e tumores hepáticos (IMAI et al., 1997). A expressão aumentada da GST-P em tumores hepáticos pode ser consequência, entre outros fatores, do processo de hipometilação de sítios CpG da região promotora do gene da GST-P, o que contribuiria para aumento da expressão desse gene (STEINMETZ et al., 1998). Em particular, a formação de heterodímeros de Nrf2/MafK, um dos eventos chaves para a ativação de GST-P em hepatócitos iniciados, leva ao deslocamento do complexo C/EBP α /CA150 e ligação ao amplificador GPE1 ativando a região promotora do gene da GST-P (HIGASHI et al., 2004; SAKAI; MURAMATSU, 2007).

Para indução da hepatocarcinogênese química em roedores, adota-se frequentemente um modelo de duas fases (*two-stage model*): iniciação com um agente genotóxico (geralmente a dietilnitrosamina ou DEN), seguida da fase de promoção com administração de substâncias que aumentam a formação de tumores após a iniciação por promoverem a expansão clonal de células iniciadas (HEINDRYCKX et al., 2009). É importante ressaltar que a inflamação e a fibrose fornecem o microambiente necessário para a promoção da hepatocarcinogênese (LUEDDE et al., 2011; ELLIS et al., 2012).

Existem diversos modelos experimentais para o estudo da fibrose hepática como, por exemplo, aqueles induzidos por cirurgia, rações deficientes em metionina e/ou colina ou os de modelos geneticamente modificados de deleção de genes específicos. Todavia, os modelos induzidos por agentes hepatotóxicos são considerados como formas clássicas de indução da fibrose (STARKEL; LECLERCQ, 2011). O tetracloreto de carbono (CCl_4) é um das mais potentes hepatotoxinas e sua hepatotoxicidade envolve duas fases. A primeira é que o CCl_4 é metabolizado pelo citocromo P450 formando o radical triclorometil. Este radical é altamente energético e causa peroxidação lipídica e dano na membrana plasmática. Segundo as células de Kupffer induz a resposta inflamatória, que leva a secreção de citocinas, quimiocinas e outros fatores pro-inflamatórios. Estes fatores não apresentam efeito citotóxico direto, pois atraem e ativam monócitos, neutrófilos e linfócitos que contribuem no dano no tecido hepático. O repetido acontecimento destes ciclos leva a injúria, inflamação, pode levar a fibrose, LPN e eventual HCC (HEINDRYCKX et al., 2009). Neste sentido, a adoção de um modelo experimental utilizando CCl_4 é útil na avaliação de substâncias capazes de modular a etapa de

promoção da hepatocarcinogênese com ou sem um contexto de inflamação e fibrose/cirrose na dependência da dose utilizada (IWAI et al., 2002).

Diante das informações acima, nossa hipótese é a de que a suplementação com a Vitamina D poderia apresentar uma eventual atividade quimiopreventiva no desenvolvimento da hepatocarcinogênese em modelo de iniciação com aDEN e de promoção com o CCl₄ (TAKEKI et al., 2013). A DEN foi selecionada por induzir a formação de adutos de DNA derivada a partir de várias espécies reativas de oxigênio (ERO), levando a formação de hepatócitos iniciados e o CCl₄ pela capacidade de induzir peroxidação lipídica e hepatotoxicidade (ITO et al., 1988, MANIBUSAN et al., 2012).

1.4 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito inibidor da suplementação com VD sobre o desenvolvimento de LPN positivas para a GST-P em animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese induzido por DEN e CCl₄.

1.4.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o número e tamanho médio de LNP em animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese induzido pela DEN/ CCl₄ e suplementados com VD.
- Avaliar a proliferação celular em animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese induzido pela DEN/CCl₄ e suplementados com VD;
- Avaliar a expressão de VDR no fígado de animais submetidos ao modelo de hepatocarcinogênese induzido pela DEN/CCl₄ e suplementados com VD;

2. Material e Métodos

2.1 Animais e Ambiente de Experimentação

Foram utilizados 90 ratos da linhagem Wistar provenientes da colônia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Campus de Ribeirão Preto/SP), os quais foram mantidos durante o período experimental no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). A sala de experimentação foi mantida com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), umidade ($55 \pm 10 \%$) e luminosidade (12 h claro e 12 h escuro) controladas e exaustão de ar contínua.

Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno (4-5/caixa) com tampa de aço inoxidável na forma de grade forrada com maravalha branca de pinho branco autoclavada. Tanto as caixas quanto a maravalha foram trocadas 3x/semana. Durante todo o período experimental, os ratos receberam água e ração específica para roedores (Presence[®]). Foram registrados o peso corpóreo e o consumo de ração em dias alternados.

2.2 Delineamento

Após o período de aclimação de sete dias, 80 animais foram iniciados com dose única intraperitoneal (i.p.) de DEN (Sigma-Aldrich[®], EUA; 200 mg/Kg de peso corpóreo diluída em solução salina 0,9%) (ITO et al., 1988). Além disso, 10 animais pertencentes ao grupo 1 (G1, grupo controle não submetido à nenhum tratamento) receberam apenas a administração i.p. do veículo da DEN (5ml/Kg). Duas semanas após a iniciação com a DEN, o tratamento semanal com 1,0 mL/Kg de tetracloreto de carbono (CCl_4 , Dinâmica[®] - Brasil) diluída em óleo de milho (2,5 ml/kg) ; de peso corpóreo diluído em óleo de milho) por intubação gástrica foi iniciado e se prolongou até a 18ª semana do experimento. O CCl_4 foi utilizado como agente promotor para o desenvolvimento de lesões pré-neoplasias hepáticas iniciadas pela DEN (IWAI et al., 2002).

O tratamento com VD começou duas semanas após a iniciação com DEN. Para tanto os 80 animais iniciados foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (G2-G6, n = 16/grupo), a saber:

- G2 (Controle Positivo): grupo de animais que recebeu apenas o veículo para solubilizar a VD indicado pelo fabricante (água, 2,5 mL/Kg de peso corpóreo, em dias

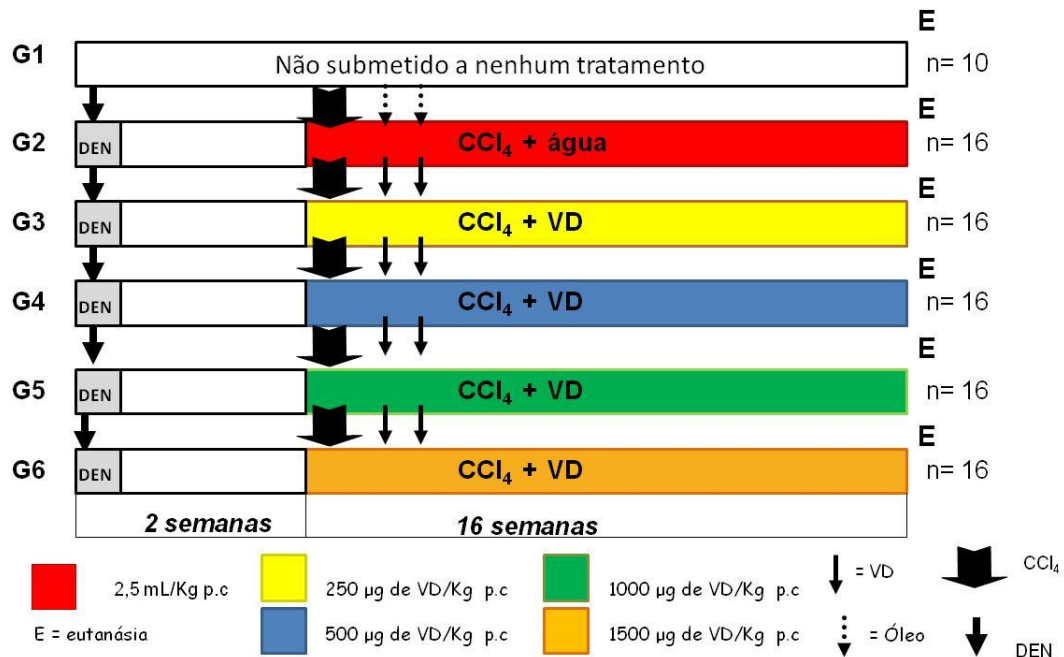
alternados, por semana por intubação gástrica, durante 18 semanas consecutivas (da 2^a a 16^a semana de experimento). Este grupo foi utilizado como controle dos demais grupos experimentais;

- G3: grupo de animais que recebeu VD (BASF[®], Dinamarca) na dosagem de 250 µg de VD/Kg de peso corpóreo dissolvida em água (2,5 mL/Kg de peso corpóreo), em dias alternados, por intubação gástrica, durante 18 semanas consecutivas (da 2^a a 16^a semana de experimento);
- G4: grupo de animais que recebeu VD (BASF[®], Dinamarca) na dosagem de 500 µg de VD/Kg de peso corpóreo dissolvida em água (2,5 mL/Kg de peso corpóreo), em dias alternados, por intubação gástrica, durante 16 semanas consecutivas (da 2^a a 16^a semana de experimento);
- G5: grupo de animais que recebeu VD (BASF[®], Dinamarca) na dosagem de 1000 µg de VD/Kg de peso corpóreo dissolvida em água (2,5 mL/Kg de peso corpóreo), em dias alternados, por intubação gástrica, durante 18 semanas consecutivas (da 2^a a 16^a semana de experimento);
- G6: grupo de animais que recebeu VD (BASF[®], Dinamarca) na dosagem de 1500 µg de VD/Kg de peso corpóreo dissolvida em água (2,5 mL/Kg de peso corpóreo), em dias alternados, por intubação gástrica, durante 18 semanas consecutivas (da 2^a a 16^a semana de experimento);

Apesar da carência de estudos de suplementação com VD em animais, as dosagens estabelecidas podem ser consideradas seguras com base na DL-50 oral para ratos (84.000 µg) de VD/Kg de peso corpóreo) e em estudo prévio em que os autores não observaram ausência de efeito tóxico em ratos tratados com dosagem de 1.500 µg de VD/Kg de peso corpóreo/dia durante 15 semanas consecutivas (IRVING et al., 2011).

Os animais foram sacrificados no final das 18^a semana de experimento por meio de secção da veia cava inferior após jejum de 12 h e sob anestesia com dose única intraperitoneal de fenobarbital sódico (30 mg/Kg de peso corpóreo). O fígado dos animais foi removido, avaliado macroscopicamente e pesado. Amostras hepáticas foram fixadas em formalina tamponada 10% ou congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

Figura 3- Esquema representativo do delineamento experimental.



2.3 Análises Bioquímicas (ALT, AST, Vitamina D circulante (25OHD) e Calcitriol (1,25OHD)).

Antes da eutanásia, cerca de 3 mL de sangue foram coletados através de punção cardíaca para a determinação da enzima alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e VD. As transaminases foram determinadas por procedimentos padrões de espectrofotometria. As concentrações de VD e calcitriol foram determinadas por HPLC (*High Performance Liquid Chromagraphy*) (CHEN et al., 2007). Os níveis séricos de AST e 25OH foram realizados VITAE Cromatografia Líquida em Análises Clínicas LTDA e os níveis de cálcio e fósforo foram determinados utilizando-se de kits comerciais da Bioclin®, respectivamente.

2.4 Análises Microscópicas

Para as análises microscópicas, amostras de tecido hepático foram obtidos por ocasião da eutanásia dos animais. Em seguida, estes fragmentos foram submetidos às técnicas rotineira de desidratação, inclusão em parafina e cortes histológicos de aproximadamente 5

µm de espessura de cada lobo hepático foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE). Alterações histológicas hepáticas e detecção de lesões pré-neoplásicas foram analisadas segundo critérios descritos na literatura (BANNASCH; ZERBAN, 1992; BANNASCH et al., 2003).

2.4.1 Imunohistoquímica para a enzima glutathione S-transferase, forma placentária (GST-P) e Ki-67.

Cortes histológicos de 5µm foram mantidos em estufa por 24 horas e em seguida desparafinizados com banhos de xilol (3 vezes) de 10 minutos, posteriormente foram hidratados pela passagem do material por banhos sucessivos em álcool absoluto (3 vezes), álcool 95%, álcool 70% e água destilada.

Em seguida as lâminas passaram pelo bloqueio da peroxidase endógena, no qual foram incubadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 a 3%) em tampão fosfato (PBS, pH 7,2), durante 10 minutos e mantidas em ambiente escuro. Então os cortes histológicos passaram pelo bloqueio de ligações inespecíficas, realizada na solução de leite desnatado a 1% (Molico®) diluída em PBS, por 1 hora à 4°C (geladeira).

Após o bloqueio no leite desnatado, os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos primários anti-GST-P policlonal de coelho (1:1000, Medical & Biological Laboratories MBL®) e Ki-67 monoclonal de coelho (1:50, Antibodies, Proteins, Kits and Reagents for Life Science, ABCAM®). Então, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com biotina (*Biotinylated Link Universal*) por 20 minutos, seguida de lavagem com PBS e mais 20 minutos da Streptavidina- HRP da DAKO®.

A expressão da GST-P tem sido utilizada como marcador imunoistoquímico de lesões pré-neoplásicas (LPN) no fígado de ratos (TAKAHASHI et al., 2008). As LPN positivas para a GST-P foram analisadas utilizando-se de fotomicroscópio Nikon (Microphot-FXA) acoplado a um microcomputador, por meio do programa KS-300 (Kontron Elektronik, Alemanha). Com esse recurso foram medidas a área de cada corte histológico do fígado (cm^2) e o número de LPN GST-P⁺ por animal (focos/ cm^2) em três classes de tamanho: < 0,5 mm^2 , 0,5-1,0 mm^2 e > 1,0 mm^2 (KISHIMA et al., 2000).

Para a avaliação dos níveis de proliferação celular pelo Ki-67, a leitura das lâminas foi por varredura em todo o corte em objetiva de 40x. Os resultados foram expressos como número de células marcadas pelo Ki-67/mm² de tecido hepático.

2.5 Western Blotting para VDR e β -actina .

Fragmentos hepáticos de cerca de 180 mg foram coletados e congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados a -80° C. Em seguida, os fragmentos foram homogeneizados em tampão de extração de proteínas (Tris-HCl 500 mM pH 7,6; NaCl 0,2 M; Triton X-100 1%; CaCl₂ 10 mM; inibidor de protease 2 μ l/100 mL) na proporção de 30 mg de tecido /100 μ l de tampão e mantidos durante 4° C durante 2 h. Após este procedimento, o material extraído foi centrifugado a 400 rpm por 20 min. a 4° C e o sobrenadante coletado para quantificação de proteína pelo método de Bradford. Em seguida, as amostras foram descongeladas e foram aplicadas no gel 10 μ l da amostra com 10 μ l de *laemmli* (SDS 2%, Glicerol 10%, β - mercapto, Trisma base, azul de bromofenol e água destilada) e aquecidas a 90° C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, realizada a 4°C durante 80 minutos a 120 Volts utilizando a solução de corrida (Trisma, Glicina, SDS e água destilada). A transferência da proteína do gel para membrana foi realizada a 4° C, por 90 minutos a 0,3 ampères utilizando solução de transferência (Trisma base 25mM, Glicina, Metanol 20%, SDS 0,02% e água destilada). A membrana foi bloqueada em solução contendo leite desnatado (10%) dissolvido em TBS-T (Tris 0,05 M; NaCl 0,15 M; Tween 20 1%; pH 7,2) durante 1 h. Na sequencia, houve a incubação com anticorpo primário anti-CYP27A1 policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology, EUA) e anticorpo secundário anti-IgG de cabra ou anticorpo primário anti-VDR monoclonal de camundongo (Santa Cruz Biotechnology, EUA) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo/coelho e, finalmente, as membranas foram reveladas com o revelador West Pico da GE® e analisados no Box G ®.

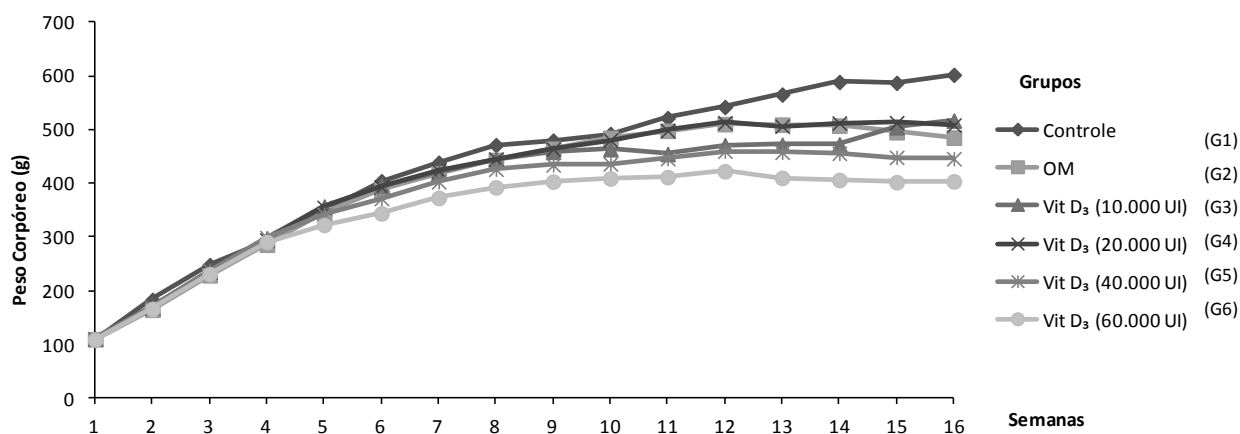
2.6 Análise Estatística

Os dados de peso corpóreo, ingestão de ração, peso relativo do fígado, marcadores séricos níveis de proliferação celular, número médio de LPN positivas para a GST- P e a análise nos níveis proteicos de VDR foram analisados pelos testes de ANOVA ou de Kruskal-Wallis. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Software da Jandel Sigma Stat (Jandel Corporation, EUA) e nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

3. Resultados

Durante o experimento em biotério, os animais foram pesados em dias alternados e os pesos médios semanais por grupo foram apresentados na forma de gráfico (Figura 2). O grupo controle não-tratado (G1) apresentou maior evolução de peso corpóreo em relação aos demais grupos que receberam doses semanais de CCl_4 (G2-G6). Em relação aos grupos submetidos ao protocolo DEN/ CCl_4 , foi observado menor evolução de peso corpóreo médio nos grupos G5 e G6.(1000 e 1500 $\mu\text{g/kg}$ de VD, respectivamente) Os grupos G3 e G4 que receberam as doses de 250 $\mu\text{g/kg}$ e 500 $\mu\text{g/kg}$ de VD apresentaram evolução de peso corpóreo muito semelhante aos grupos G1 e G2. O grupo G5 apresentou melhor evolução de peso corpóreo médio e de ganho de peso em relação ao grupo G6 que recebeu a maior dose de VD e também apresentou menor ganho de peso corpóreo em comparação aos demais grupos.

Figura 4: Efeitos da suplementação da 25OHD (10.000 UI a 60.000 UI) em grupos de animais iniciados com dose única de dietilnitrosamina (DEN) e que receberam doses semanais de CCl_4 .



G1: Grupo Controle, G2: Óleo de Milho, G3: 250 $\mu\text{g/kg}$, G4: 500 $\mu\text{g/kg}$, G5: 1000 $\mu\text{g/kg}$ de VD e G6: 1500 $\mu\text{g/kg}$ de VD.

A Tabela 1 apresenta os valores finais do peso corpóreo, ganho de peso, consumo de ração, peso relativo do fígado e níveis séricos de AST dos animais que receberam a suplementação de VD comparada com o grupo controle não tratado e OM (controle positivo) que não receberam nenhum tipo de suplementação. Uma redução significativa ($p < 0,001$) no peso corpóreo final e do ganho de peso foi observado nos grupos G5 e G6 que receberam as

doses de 1000 e 1500 µg/kg de VD quando comparado aos grupos controle não-tratado e OM (G1 e G2). Em relação ao consumo de ração foi observada redução significativa ($p < 0,001$) na ingestão de ração nos grupos G5 e G6 (1000 e 1500 µg/kg de VD, respectivamente) comparando com os grupos controle não tratado e OM (G1 and G2). O peso relativo do fígado foi significativamente maior ($p < 0,001$) nos grupos G5 e G6 quando comparado aos grupos controle e OM (G1 e G2). Por outro lado, os valores de AST séricos foram semelhantes entre os grupos experimentais.

Tabela 1 – Efeitos da suplementação da VD sobre dados de peso corpóreo final, ganho de peso, consumo de ração, peso hepático relativo e níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) dos diferentes grupos experimentais¹.

	Grupos ²	No. de ratos	Peso Corp. Final (g)	Ganho de peso (g)	Consumo de Ração (g/rato/dia)	Peso Hepático Rel. (%)	Níveis de AST (U/L)
	<i>Sem suplementação</i>						
(G1)	Controle	10	558.70±46.07	238.80±34.00	29.93±2.63	2.30±0.08	45.33±7.37
(G2)	OM ¹	10	498.44±45.66	195.44±37.02	29.00±3.21	2.73±0.34	53.11±12.85
	<i>Com suplementação</i>						
(G3)	Vit D ₃ (10.000 UI) ¹	10	508.73±77.16	205.82±57.19	30.12±3.30	2.71±0.15	58.67±11.24
(G4)	Vit D ₃ (20.000 UI) ¹	10	515.15±55.54	206.39±40.81	29.70±3.02	2.70±0.17	54.75±10.23
(G5)	Vit D ₃ (40.000 UI) ¹	10	452.08±69.17*	149.64±52.80*	27.31±4.78*,**	2.89±0.27*	58.90±12.98
(G6)	Vit D ₃ (60.000 UI) ¹	10	407.18±73.36*,**	106.70±51.70*,**	24.86±4.82*,**	2.88±0.18*	58.67±20.92

¹ Valores expressos como média ± DP; ² G1: Grupo Controle, G2: Óleo de Milho, G3: 250 µg/kg, G4: 500µg/kg, G5: 1000 µg/kg de VD e G6: 1500 µg/kg de VD;

(*) Diferença estatística do grupo controle, $p < 0,001$.

(**) Diferença estatística do grupo OM, $p < 0,001$.

Na análise histológica do fígado não foi observado sinais evidentes de hepatotoxicidade nos grupos tratados com CCl₄ (Figura 3). . A análise mais detalhada do tecido hepático mostra apenas o desenvolvimento de leve processo de esteatose micro e macrogoticular nos grupos tratados com CCl₄ , ausente nos grupos G5 e G6 que receberam as doses de 1000 e 1500 µg/kg de VD quando comparado ao grupo OM (Figura 3 B-E).

O valores dos índices de proliferação celular nos fígados dos diferentes grupos experimentais está apresentado na Figura 4. Os dados de proliferação celular (Ki-67) indicam que o tratamento com CCl₄ aumentou de forma significativa ($p < 0,001$) os índices de

proliferação celular no fígado (Figura 4 e 5). O tratamento com VD nas maiores doses (grupos G5 e G6) reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) os níveis de proliferação celular hepatocítica induzidos pelas aplicações de CCl_4 . (Figura 4 e 5).

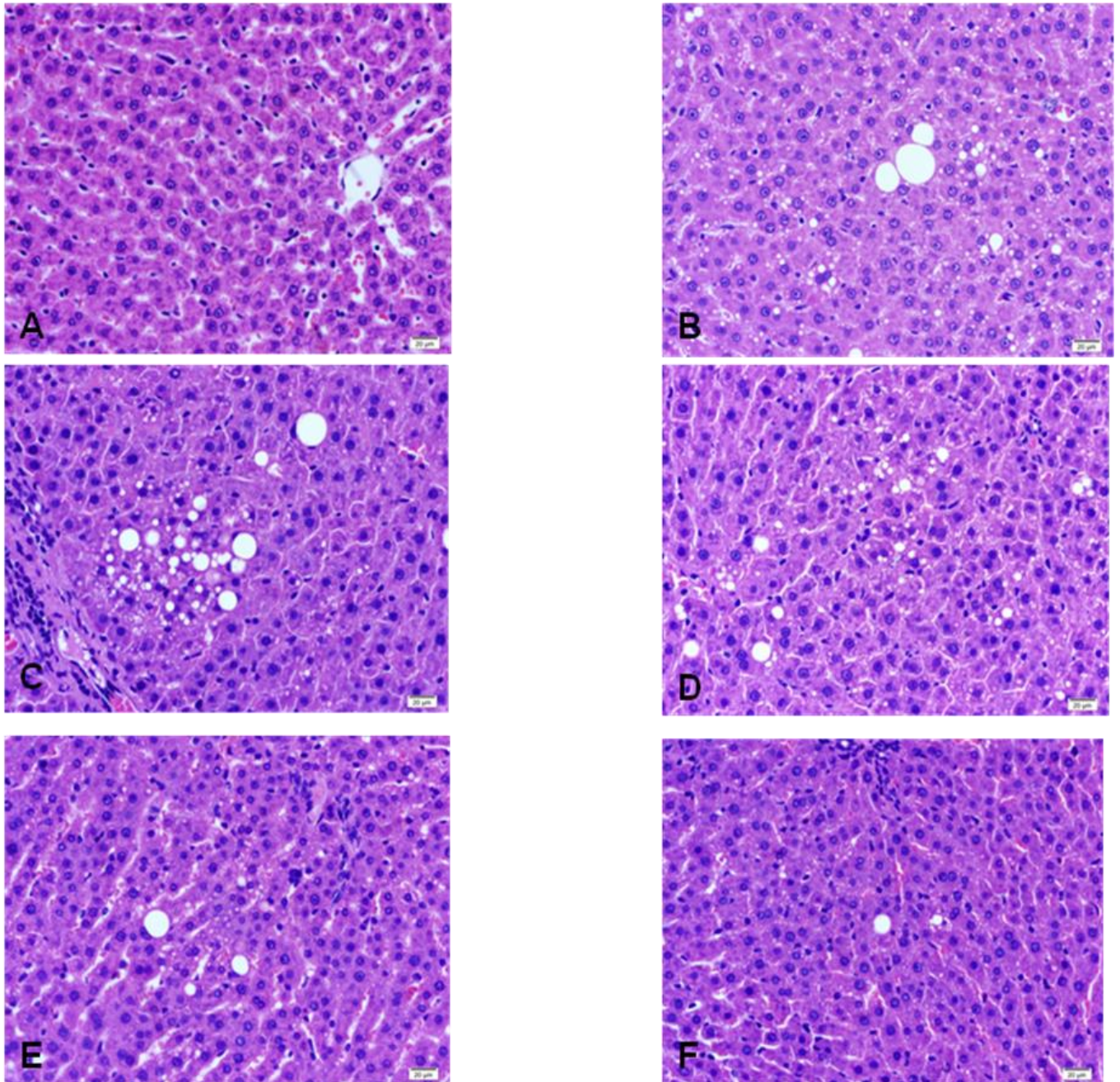


Figura 5- Cortes histológicos de fígado corados com HE de animais dos grupos (A = Grupo controle, B = Grupo Controle Positivo, C= Grupo VD1 10.000UI de vit D, D = Grupo VD2 20.000UI de vit D, E = Grupo VD3 40.000 UI e F= VD4 60.000UI). Objetiva 40x

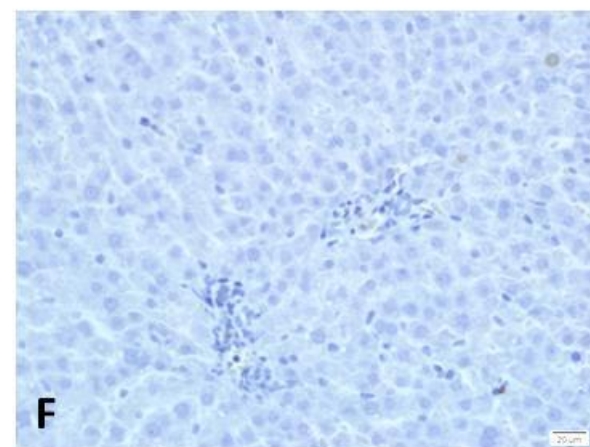
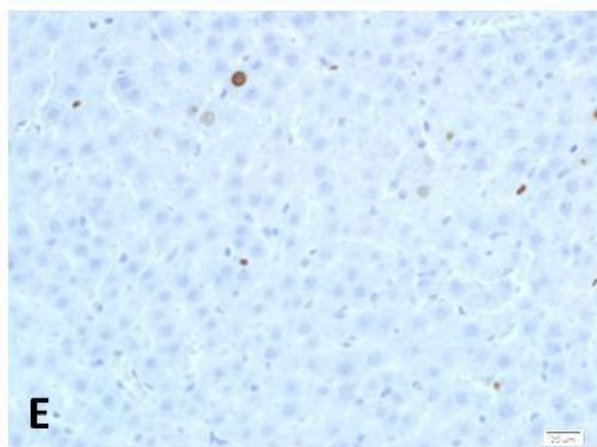
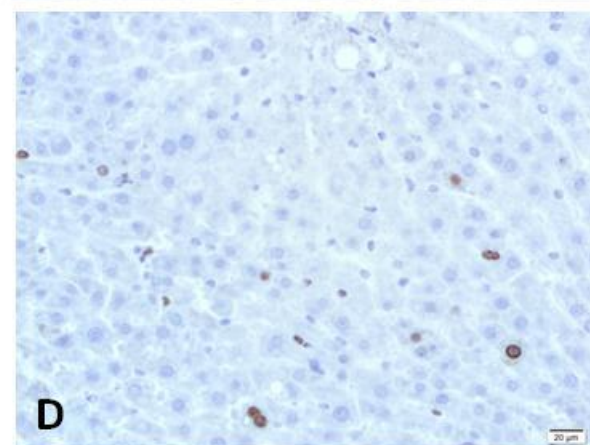
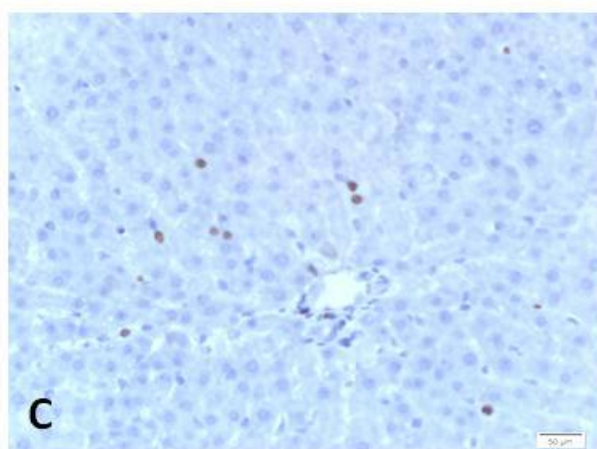
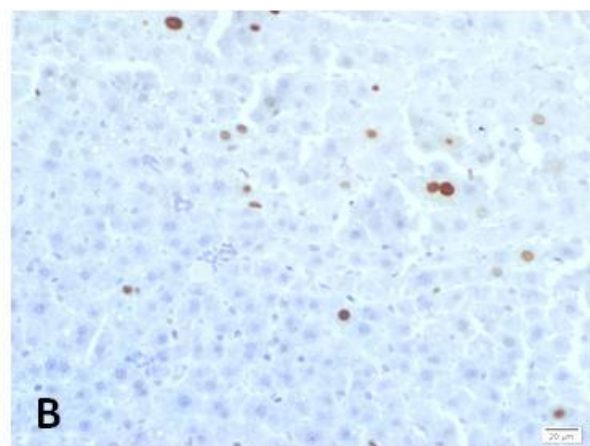
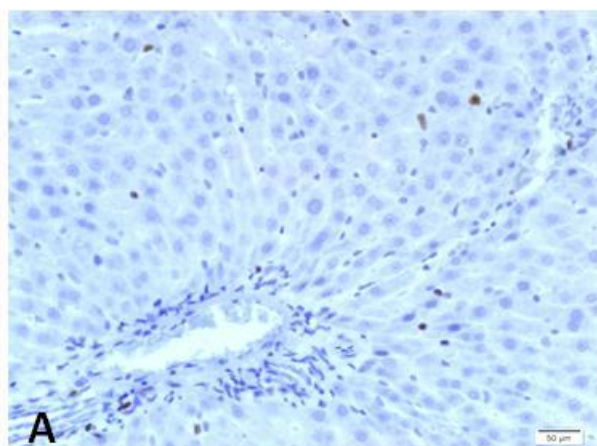


Figura 6- Cortes histológicos de fígado corados imunoistoquimicamente para Ki-67 (núcleos com coloração em marrom) (A = Grupo controle, B = Grupo Controle Positivo, C= Grupo VD1 10.000UI de vit D, D = Grupo VD2 20.000UI de vit D, E = Grupo VD3 40.000 UI e F= VD4 60.000UI). Objetiva 40x

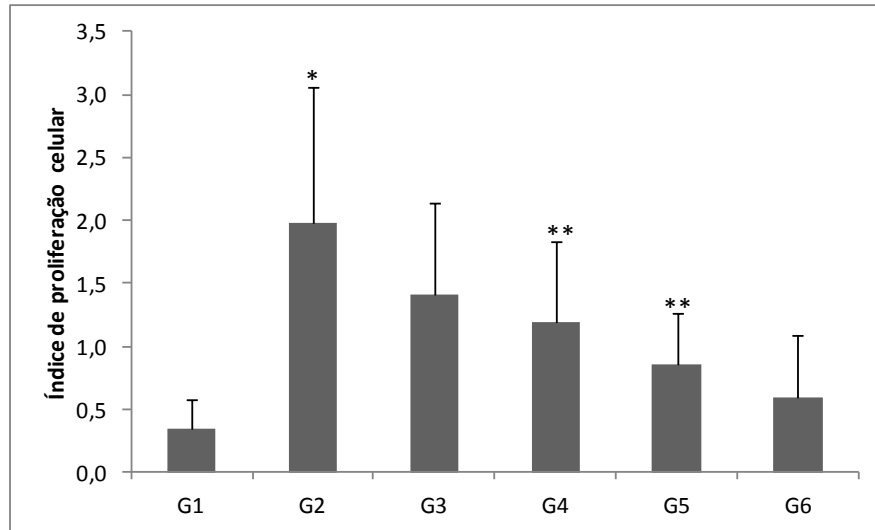


Figura 7- Níveis de proliferação celular (Ki-67) em hepatócitos nos diferentes grupos experimentais. G1= controle não tratado; G2 = controle positivo e G3 = 10.000 UI vit D3, G4 = 200.000 UI Vit D3, G5 = 40.000 UI vit D3, G6 = 60.000 UI vit D3. ($p < 0,001$ no teste de Bonferroni). *,** Diferença em relação aos grupos G1 e G2, respectivamente.

As lesões hepáticas pré-neoplásicas (LPN) e positivas para a enzima GST-P (Figura 6) foram analisadas e os dados apresentados como número médio total por área hepática (LPN/cm²) e em três classes de tamanho (< 0,5 mm², 0,5-1,0 mm² e > 1,0 mm²) por área hepática (KISHIMA et al., 2000). Os animais não iniciados com a DEN não desenvolveram LPN positivas para a GSTP. O número médio total de LPN positivas para a GSTP por área hepática não diferiu entre os grupos iniciados pela DEN (Figura 7). Entretanto, o tratamento com a VD nas maiores doses (grupos G5 e G6) reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) o número médio de LPN positivas para a GST-P maiores que 1,0 mm (Figura 8).

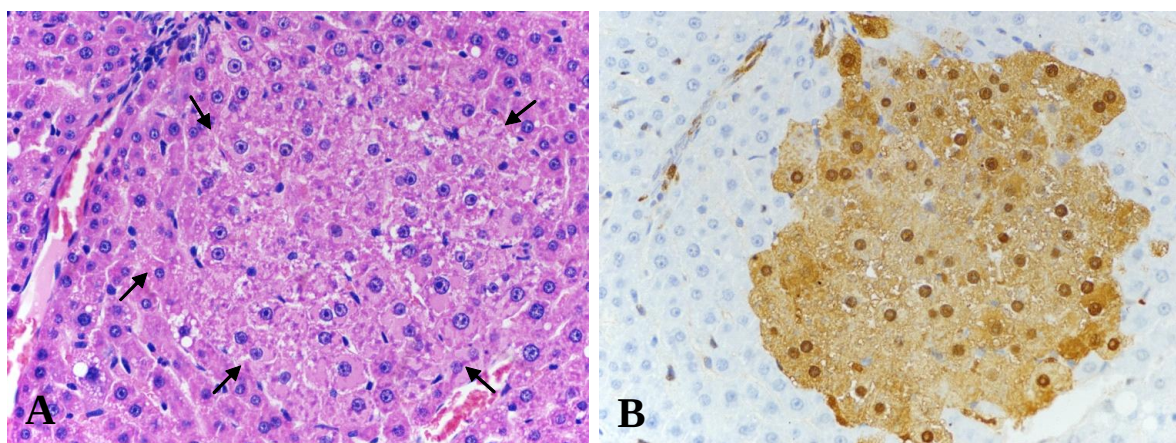


Figura 8 - Cortes histológicos seriados de fígado corados com HE (A) ou imunoistoquimicamente para GST-P (B) de animal do grupo OM (DEN/CCL₄) (objetiva 40x).

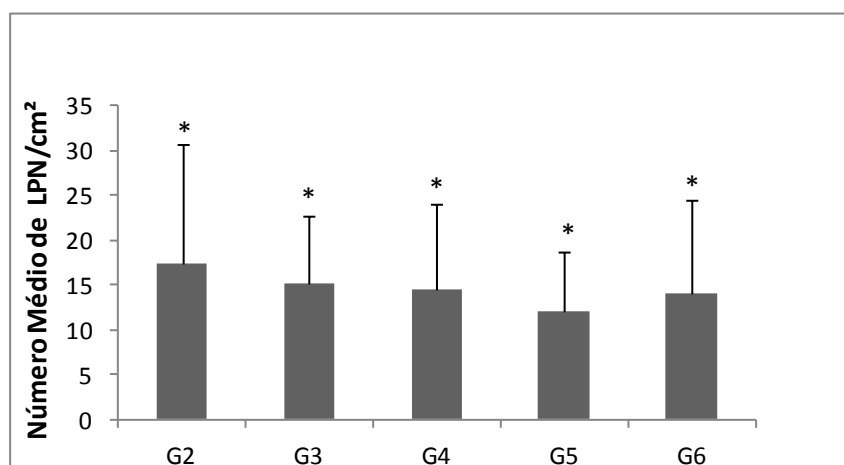


Figura 9- Número médio total de LPN positivas para a GST-P nos diferentes grupos experimentais. G2 = controle positivo e G3= 10.000 UI, G4= 200.000 UI, G5= 40.000 UI, G6 = 60.000 UI ($p < 0,001$ no teste de One Way Analysis of Variance e $p < 0,05$ no teste de contraste de Student-Newman-Keuls). * Diferença em relação ao grupo G1.

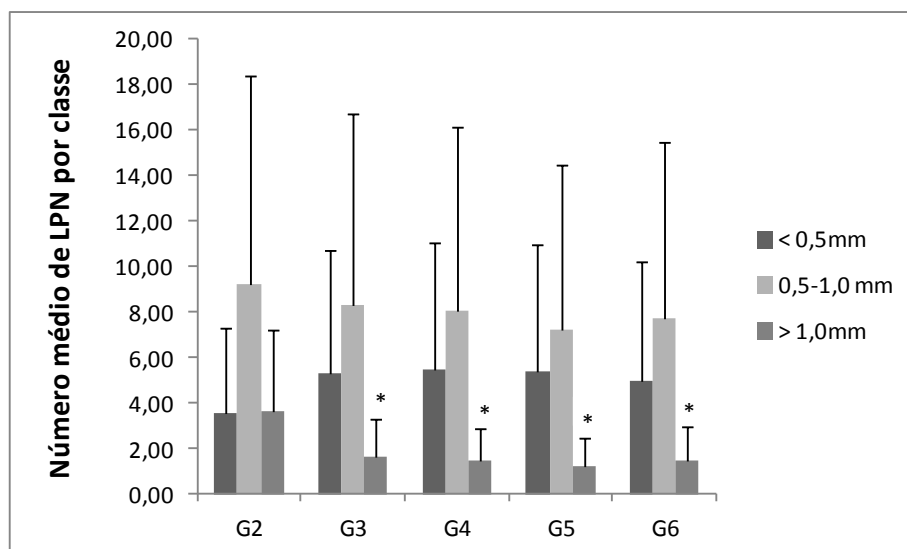


Figura 10- Análise de LPN positivas para a GST-P em classes de tamanho nos grupos iniciados com a DEN. G2 = OM, controle positivo e G3= 10.000 UI, G4= 200.000 UI , G5= 40.000 UI, G6= 60.000 UI. ($p < 0,001$ no teste de Kruskal-Wallis e $p < 0,001$ no teste de contraste de Student-Newman-Keuls). * Diferença em relação aos grupos G2.

De acordo com os exames bioquímicos, os níveis séricos de 25OHD foram aumentados de forma significativa ($p < 0,001$) nos grupos suplementados com VD (Figura 9), sem um nítido efeito dose-resposta.

Os níveis séricos de cálcio e fósforo foram analisados nos diferentes grupos experimentais (Figuras 10-11). Os níveis de cálcio sérico foram semelhantes nos diferentes grupos experimentais enquanto os níveis de fosfato foram maiores apenas nos grupos G3 (10.000 UI) e G6 (60.000 UI) em relação aos demais grupos.

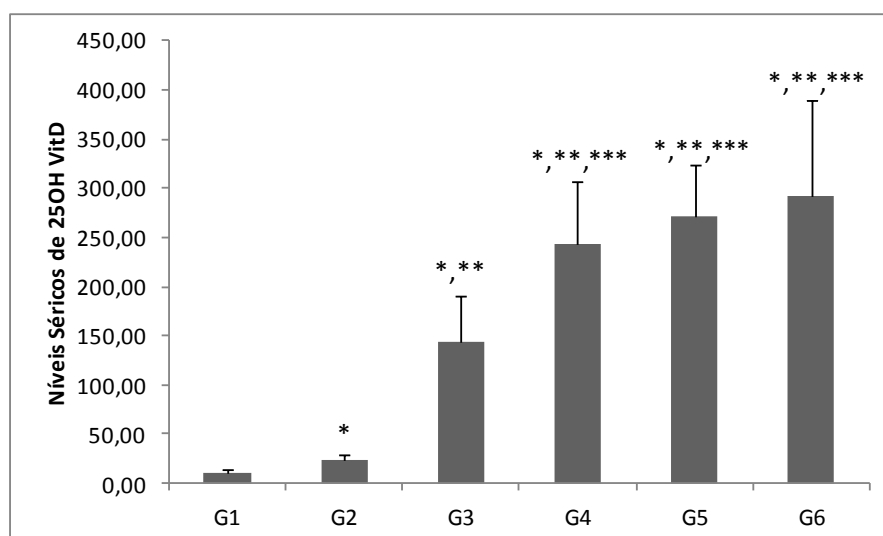


Figura 11- Níveis séricos de 25OH vit D (ng/dl) nos diferentes grupos experimentais.

G1= controle não tratado, G2= OM, controle positivo, G3= 10.000 UI, G4= 200.000 UI, G5= 40.000 UI, G6= 60.000 UI. ($p < 0,001$ no teste de Kruskal-Wallis com teste de contraste de Student-Newman-Keuls). *, **, *** Diferença em relação aos grupos G1, G2 e G3, respectivamente.

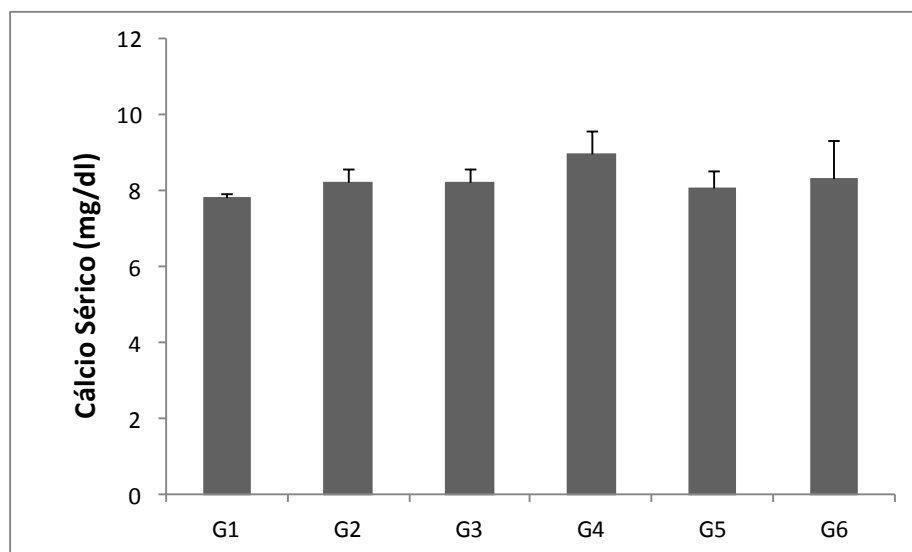


Figura 12- Valores do cálcio sérico mg/dl nos diferentes grupos experimentais.

G1= controle não tratado, G2= OM, controle positivo, G3= 10.000 UI, G4= 200.000 UI, G5= 40.000 UI, G6= 60.000 UI . Não apresentou diferença estatística.

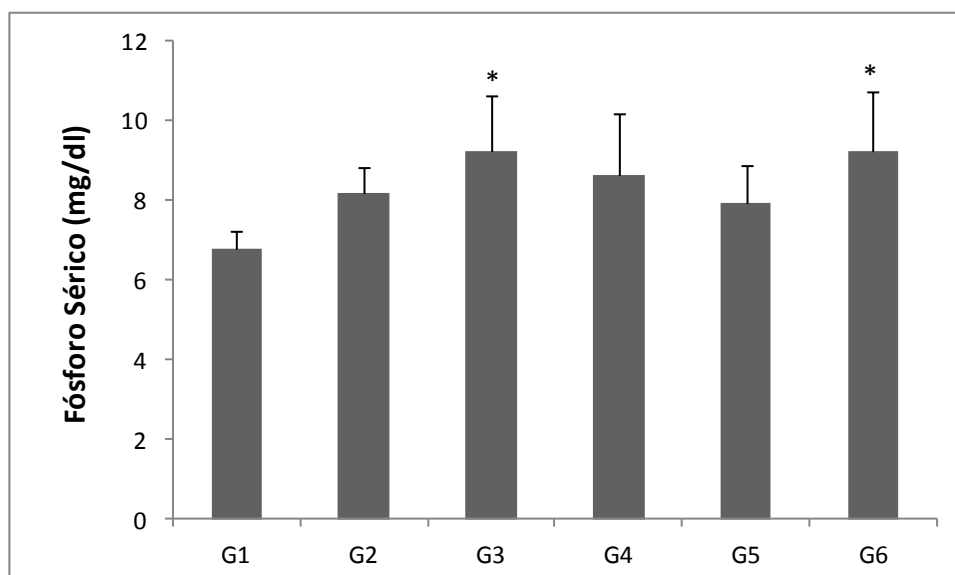


Figura 13- Valores do fosfato sérico mg/dl nos diferentes grupos experimentais.

G1= controle não tratado, G2= OM, controle positivo, G3= 10.000 UI, G4= 200.000 UI, G5= 40.000 UI, G6= 60.000 UI. ($p < 0,018$ no teste de Kruskal-Wallis e $p < 0,05$ no teste de contraste de Tukey).

* Diferença em relação ao grupo G1.

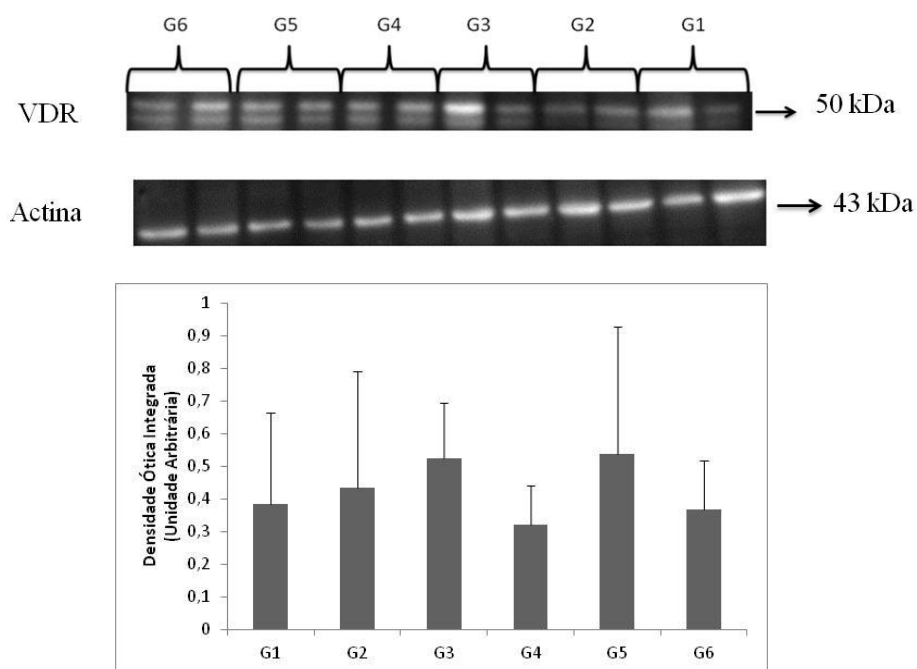


Figura 14 – Efeito da expressão do receptor da VD (VDR) nos diferentes grupos experimentais. G1= controle não tratado, G2= OM, controle positivo, G3= 10.000 UI, G4= 200.000 UI, G5= 40.000 UI, G6= 60.000 UI. Não apresentou diferença estatística.

4. Discussão

No presente estudo o tratamento oral com a VD reduziu os níveis de proliferação celular e o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas no fígado de ratos Wistar machos submetidos ao protocolo DEN/CCL₄. Entretanto como observado neste estudo, os grupos suplementados com as maiores doses de 1000 e 1500 µg/kg de VD (G5 e G6) apresentaram menor evolução de peso corpóreo, peso corpóreo final e maior perda de peso em comparação aos grupos controles G1 e G2.

No modelo experimental utilizado por Nussler et al (2013) observou-se que ratos submetidos a administração crônica com CCL₄ (1ml kg/ peso corpóreo) apresentaram diminuição significativa na densidade mineral óssea, volume ósseo e espessura trabecular. De fato, o CCL₄ interfere com a homeostase do cálcio de duas maneiras básicas: 1) promovendo o influxo de íons de cálcio para o citoplasma (por perturbar fisicamente a integridade da membrana celular através da indução da peroxidação lipídica e, em concentrações baixas, por induzir a abertura de determinados canais de transporte de cálcio da membrana celular) e, 2) por inibir o transporte ativo de íons de cálcio do citoplasma (MANIBUSAN et al., 2007). Além disso, o consumo de doses elevadas de VD pode causar a perda de peso, diminuição do apetite e desmineralização óssea (SHEPARD; DELUCA, 1980; OZKAN et al., 2012). Entretanto, no presente estudo não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de cálcio e fósforo

Nos grupos G3 e G4 que receberam doses menores de VD (250 e 500µg/kg) a evolução de peso corpóreo e de ganho foram muito semelhantes aos do grupo controle submetido somente ao protocolo DEN/CCL₄, indicando que a associação do tratamento com CCL₄ e doses mais elevadas de VD podem levar a diminuição do peso corpóreo dos animais. Como observado na Tabela 1, os grupos G5 e G6 (1000 e 1500 µg/kg de VD) apresentaram menor consumo de ração em comparação aos grupos controle G1 e G2.

O peso relativo do fígado foi maior nos grupos G5 e G6 que receberam as maiores doses de VD 1000 e 1500 µg/kg em comparação apenas com o grupo controle G1 (não tratado). Essa alteração de peso relativo hepático não foi acompanhado pelo aumento dos níveis séricos de alanina aminotransferase ou evidência de hepatotoxicidade induzida pelos tratamentos com CCL₄ e VD. Ao contrário, nos grupos G5 e G6 foram observados menores

graus de esteatose macro e microgoticular quando comparado com o grupo somente tratado com DEN/ CCl₄.

O metabolismo do CCl₄ ocorre através de enzimas do CYP2E1, gerando radicais livres tais como o triclorometil e o triclorometil peróxido que induzem peroxidação lipídica e esteatose (MANIBUSAN et al., 2007). A administração crônica do CCl₄ leva ao desenvolvimento de ambiente oxidativo pela formação de radicais livres e indução de peroxidação lipídica, levando a promoção das LPN (IMAI et al., 1997). As LPN ou focos de hepatócitos alterados (FHA) tem sido identificados em vários modelos de hepatocarcinogênese química em roedores (SU et al., 1997; BANNASCH et al., 2001). Mais recentemente, diferentes tipos de LPN, com similaridades morfológicas e bioquímicas, tem sido descritos em doenças hepáticas associadas ao desenvolvimento do CHC em humanos (SU et al., 1997, LIBBRECHT et al., 2005). A enzima placentária glutathiona S-transferase (GST-P) é uma marcadora importante e reproduzível na detecção de lesões pré e neoplásicas no fígado de ratos (BANNASCH et al., 2001, TSUDA et al., 2003). A detecção de LPN positivas para a GST-P se torna uma ferramenta importante na avaliação do potencial carcinogênico e anti-carcinogênico de substâncias químicas naturais ou sintéticas durante as etapas de iniciação ou promoção da hepatocarcinogênese química (BANNASCH et al., 2003).

Lesões pré-neoplásicas positivas para a GSTP foram identificadas em todos os grupos iniciados pela DEN (G2 a G6). No entanto, efeito protetor da suplementação com a VD foi observada apenas nos grupos G5 e G6 que receberam as maiores doses de VD em relação ao grupo G2 submetido apenas ao protocolo DEN/CCl₄. Esses dados de quimioprevenção pela VD estão de acordo com achados da literatura que indicam que o tratamento com essa vitamina inibe o desenvolvimento de LPN e nódulos hiperplásicos no fígado de animais iniciados com cancerígenos químicos (Karmakar et al., 2002; SAHA et al., 2001; Basak et al., 2001; Basak_& Chatterjee, 2000; Basak et al., 2000).

O tratamento oral com VD (0,3 µg em duas doses semanais) restabeleceu os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e as atividades das enzimas γ-glutamil transpeptidase (γ-GGT), glutathiona S-transferase (GST), glutathiona redutase (GRd) e glutathiona peroxidase em nódulos hiperplásicos induzidos pela administração de 3-metil-4-dimetil-amino-azobenzeno (3-Met-DAB) (Karmakar et al., 2002). O tratamento oral com VD (0,3 µg em duas doses semanais) também reduziu o desenvolvimento de nódulos hiperplásicos em animais tratados com a DEN e a estreptozocina (STZ), a substância química utilizada para indução de diabetes experimental ou promovida pelo tratamento com fenobarbital sódico (PB) (SAHA et al.,

2001; Basak et al., 2001). Além disso, a associação de e VD (0,3 µg em duas doses semanais) com vanádio (0,5 ppm na água de beber) leva a inibição do desenvolvimento de nódulos hiperplásicos no modelo DEN/PB em relação as ações isoladas destes dois compostos (Basak & Chatterjee, 2000; Basak et al., 2000). Outro estudo recente mostra também o feito protetor da VD na carcinogênese colorretal no qual o grupo que recebeu maior dose de VD na concentração de 5000UI apresentou uma diminuição significativa no desenvolvimento de LPN (focos de criptas aberrantes) em comparação com o grupo que recebeu apenas 100 UI de VD (HUMMEL et al., 2013).

O marcador de proliferação celular Ki-67 se expressa em todas as fases do ciclo celular (G_1 , S, G_2 e mitose), mas é ausente em células em repouso (fase G_0) (WINKING et al., 2004), sendo um eficiente marcador de proliferação celular no fígado de ratos.(Gerlach et al., 1997). No presente estudo, houve uma diminuição significativa nos níveis de proliferação celular pelo Ki-67 nos grupos que receberam a suplementação da VD (grupos G3-G6), mostrando a eficácia do tratamento com essa vitamina, embora sem um efeito dose-resposta. O efeito sobre a redução dos níveis de proliferação celular pela suplementação de VD também foi observado em outros tecidos como colorretal e próstata (HUMMEL et al., 2013, MUNETSUNA et al., 2014). No estudo de Hummel et al. (2013) foi observado diminuição dos níveis de proliferação celular no tecido colônico no grupo que recebeu a maior dose de VD 5000UI enquanto, no estudo de Munetsuna et al. (2014) a VD levou a diminuição dos níveis proliferação celular em células imortalizadas humanas de próstata (PZ-HPV-7).

O efeito da VD é mediado pela ação do receptor de VD (VDR) e é encontrado em diversos tecidos além do fígado. Estudos sugerem que a produção extrarenal na presença do VDR combinado com 1,25OHD permite uma ação parácrina/ autócrina em da VD em vários tecidos (ABRAMOVITCH et al., 2012). De fato tem sido demonstrado que a 1,25 OHD regula a expressão de diversos genes e que desempenha um papel significativo na regulação celular, proliferação, diferenciação e apoptose (ABRAMOVITCH et al., 2012). No estudo realizado por Zhang et al. (2010) foi observado que ratos VDR-nulo desenvolveram obstrução renal unilateral em 7 dias. Em comparação com os ratos controle, os ratos de VDR-nulo desenvolveram danos renais severos e fibrose intersticial no rim obstruído e também apresentaram aumento de deposição de colágeno e outras proteínas de MEC. Diferente do rim, no fígado as células estreladas hepáticas (CEH) apresentam grande quantidade de VDR, entretanto quando são ativadas em miofibroblastos observa-se diminuição da ação do VDR em 40 %, levando a formação de fibrose. Em contrapartida, quando há aumento da ingestão

de VD observa-se aumento na ação do VDR presente nas CEH, reduzindo assim a formação de fibrose (ABRAMOVITCH et al., 2011). No presente estudo os níveis de expressão hepática do VDR não foram diferentes entre os grupos experimentais, independentemente dos níveis de suplementação com a VD. Pode-se concluir que a administração do CCl₄ utilizada neste estudo não foi suficiente para causar danos hepáticos importantes e suficientes para levar a ativação das CEH e consequentemente, alterações na expressão do VDR no fígado dos animais.

5. Conclusão

A deficiência de VD está relacionada com diversas doenças tais como as doenças hepáticas, diabetes, obesidade, doenças do coração e câncer (HOLICK, 2003, CHAGAS et al., 2012). Atualmente, estima-se mais de 1 bilhão de crianças e adultos com risco de deficiência de VD, o que leva a um cenário preocupante de saúde pública (HOLICK, 2011, CHAGAS et al., 2012). Baixos níveis de vitamina D tem sido associados ao desenvolvimento de esteato-hepatite não-alcoólica (NASH), desenvolvimento de cirrose hepática e evolução das hepatites virais (ARTEH et al., 2010; MALHAM et al., 2011; KASAPOGLU et al., 2013). Diante deste cenário, o presente trabalho mostrou a importância da suplementação da VD na redução do desenvolvimento de LPN no fígado e diminuição dos níveis de proliferação celular causada pelos agentes químicos carcinogênicos como a DEN e CCl₄ utilizados neste estudo.

6.0. Referências

ABRAMOVITCH, S. et al. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. **Gut**, v. 60, n. 12, p. 1728–1737, dez. 2011.

ARTEH, J.; NARRA, S.; NAIR, S. Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 55, n. 9, p. 2624–2628, set. 2010.

ASHAM, E. H.; KASEB, A.; GHOBRIAL, R. M. Management of hepatocellular carcinoma. **The Surgical clinics of North America**, v. 93, n. 6, p. 1423–1450, dez. 2013.

ATERMAN, K. Hepatic neoplasia: reflections and ruminations. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 427, n. 1, p. 1–18, 1995.

BAEKE, F. et al. Vitamin D signaling in immune-mediated disorders: Evolving insights and therapeutic opportunities. **Molecular aspects of Medicine**, v. 29, n. 6, p. 376–387, dez. 2008.

BANNASCH, P.; HAERTEL, T.; SU, Q. Significance of hepatic preneoplasia in risk identification and early detection of neoplasia. **Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 1, p. 134–139, fev. 2003.

BANNASCH, P.; NEHRBASS, D.; KOPP-SCHNEIDER, A. Significance of hepatic preneoplasia for cancer chemoprevention. **IARC scientific publications**, v. 154, p. 223–240, 2001.

BANNASCH, P.; ZERBAN, H. Predictive value of hepatic preneoplastic lesions as indicators of carcinogenic response. **IARC scientific publications**, n. 116, p. 389–427, 1992.

BASAK, R.; CHATTERJEE, M. Combined supplementation of vanadium and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibit placental glutathione S-transferase positive foci in rat liver carcinogenesis. **Life Sciences**, v. 68, n. 2, p. 217–231, 1 dez. 2000.

BASAK, R.; BHATTACHARYA, R.; CHATTERJEE, M. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits rat liver ultrastructural changes in diethylnitrosamine-initiated and phenobarbital promoted rat hepatocarcinogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 81, n. 2, p. 357–367, 26 mar. 2001.

BASAK, R.; SAHA, B. K.; CHATTERJEE, M. Inhibition of diethylnitrosamine-induced rat liver chromosomal aberrations and DNA-strand breaks by synergistic supplementation of vanadium and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1502, n. 2, p. 273–282, 18 out. 2000.

BISHAYEE, A. et al. Suppression of the inflammatory cascade is implicated in resveratrol chemoprevention of experimental hepatocarcinogenesis. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 6, p. 1080–1091, jun. 2010.

BONOVAS, S. et al. Cancer chemoprevention: a summary of the current evidence. **Anticancer Research**, v. 28, n. 3B, p. 1857–1866, jun. 2008.

BROSE, M. S. et al. Management of Sorafenib-Related Adverse Events: A Clinician's Perspective. **Seminars in Oncology**, v. 41 Suppl 2, p. S1–S16, fev. 2014.

CARLBERG, C.; CAMPBELL, M. J. Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor. **Steroids**, v. 78, n. 2, p. 127–136, fev. 2013.

CAROBENE, A. et al. A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and γ -glutamyl transferase. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC**, v. 51, n. 10, p. 1997–2007, out. 2013.

CHAGAS, C. E. A. et al. Folic acid supplementation during early hepatocarcinogenesis: cellular and molecular effects. **International Journal of Cancer. Journal**, v. 129, n. 9, p. 2073–2082, 1 nov. 2011.

CHEN, T. C. et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 460, n. 2, p. 213–217, 15 abr. 2007.

CHIANG, K.-C. et al. Hepatocellular carcinoma and vitamin D: a review. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, n. 11, p. 1597–1603, nov. 2011.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: beyond bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1287, p. 45–58, maio. 2013.

DING, J.; WANG, H. Multiple interactive factors in hepatocarcinogenesis. **Cancer letters**, 25 dez. 2013.

DIXON, K. M.; MASON, R. S. Vitamin d. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 5, p. 982–985, maio 2009.

EBERT, R.; SCHÜTZE, N.; ADAMSKI, J.; JAKOB, F. Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 248, n. 1-2, p. 149–159, 27 mar 2006.

ELLIS, E. L.; MANN, D. A. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1171–1180, maio 2012.

EL-SERAG, H. B. Hepatocellular Carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 12, p. 1118–1127, 2011.

FALLETI, E. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma in alcoholic cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 24, p. 3016–3024, 28 jun. 2010.

FARBER, E.; PARKER, S.; GRUENSTEIN, M. The resistance of putative premalignant liver cell populations, hyperplastic nodules, to the acute cytotoxic effects of some hepatocarcinogens. **Cancer Research**, v. 36, n. 11 Pt 1, p. 3879–3887, nov. 1976.

FERLAY J, SOERJOMATARAM I, ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY, F (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: < http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf >. (Acesso em: 10. jan. 2014)

FIRRINCIELI, D. et al. Illuminating liver fibrosis with vitamin D. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, 12 nov. 2013.

FORNER, A.; LLOVET, J. M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1245–1255, 31 mar. 2012.

FRAGOSO, M. F. et al. Açai (Euterpe oleracea Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 58, p. 68–76, ago. 2013.

FURTADO, K. S. et al. Coffee and caffeine protect against liver injury induced by thioacetamide in male Wistar rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 111, n. 5, p. 339–347, nov. 2012.

GERLACH, C. et al. Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat. **Laboratory Investigation; A journal of technical methods and pathology**, v. 77, n. 6, p. 697–698, dez. 1997.

HASEGAWA, R.; ITO, N. Liver medium-term bioassay in rats for screening of carcinogens and modifying factors in hepatocarcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 30, n. 11, p. 979–992, nov. 1992.

HEINDRYCKX, F.; COLLE, I.; VAN VLIERBERGHE, H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. **International journal of experimental pathology**, v. 90, n. 4, p. 367–386, ago. 2009.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 266–281, 19 jul. 2007.

HUMMEL, D. M. et al. Prevention of preneoplastic lesions by dietary vitamin D in a mouse model of colorectal carcinogenesis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, p. 284–288, jul. 2013.

IMAI, T. et al. Reduction of glutathione S-transferase P-form mRNA expression in remodeling nodules in rat liver revealed by in situ hybridization. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 3, p. 545–551, mar. 1997.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**: Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde.

IRVING, A. A. et al. Supplementation by vitamin D compounds does not affect colonic tumor development in vitamin D sufficient murine models. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 515, n. 1-2, p. 64–71, nov. 2011.

ITO, N. et al. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats--an approach for a new medium-term bioassay system. **Carcinogenesis**, v. 9, n. 3, p. 387–394, mar. 1988.

ITO, N.; TAMANO, S.; SHIRAI, T. A medium-term rat liver bioassay for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals. **Cancer Science**, v. 94, n. 1, p. 3–8, jan. 2003.

ITTRICH, C. et al. Prevalidation of a rat liver foci bioassay (RLFB) based on results from 1600 rats: a study report. **Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 1, p. 60–79, fev. 2003.

JEONG, S. W.; JANG, J. Y.; CHUNG, R. T. Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis. **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 18, n. 4, p. 347–356, dez. 2012.

JONES, G. Extrarenal vitamin d activation and interactions between vitamin d2, vitamin d3, and vitamin d analogs. **Annual Review of Nutrition**, v. 33, p. 23–44, 17 jul. 2013.

KARMAKAR, R.; BANIK, S.; CHATTERJEE, M. Inhibitory effect of vitamin D3 on 3'methyl-4-dimethyl-amino-azobenzene-induced rat hepatocarcinogenesis: a study on antioxidant defense enzymes. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v. 2, n. 4, p. 193–199, ago. 2002.

KASAPOGLU, B. et al. Low vitamin D levels are associated with increased risk for fatty liver disease among non-obese adults. **Clinical Medicine (London, England)**, v. 13, n. 6, p. 576–579, dez. 2013.

KIM, H.-K.; YANG, T.-H.; CHO, H.-Y. Antifibrotic effects of green tea on in vitro and in vivo models of liver fibrosis. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 15, n. 41, p. 5200–5205, 7 nov. 2009.

KISHIMA, M. O. et al. Promotion of hepatocarcinogenesis by hexachlorobenzene in energy-restricted rats. **Cancer Letters**, v. 152, n. 1, p. 37–44, 28 abr. 2000.

KITSON, M. T.; ROBERTS, S. K. D-livering the message: the importance of vitamin D status in chronic liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 897–909, out. 2012.

KRICKER, A.; ARMSTRONG, B. Does sunlight have a beneficial influence on certain cancers? **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 132–139, set. 2006.

KRISHNAN, A. V. et al. The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, n. 2, p. 401–418, table of contents, jun. 2010.

KRISHNAN, A. V.; FELDMAN, D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 51, p. 311–336, 2011.

LEE, Y.; FRIEDMAN, S. Fibrosis in the liver acute protection and chronic disease. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 97, p. 151, 2010.

LIBBRECHT, L.; DESMET, V.; ROSKAMS, T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. **Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver**, v. 25, n. 1, p. 16–27, fev. 2005.

LUEDDE, T.; SCHWABE, R. F. NF- κ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 2, p. 108–118, fev. 2011.

MALHAM, M. et al. Vitamin D deficiency in cirrhosis relates to liver dysfunction rather than aetiology. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 7, p. 922–925, 21 fev. 2011.

MARSHALL, D. T. et al. Vitamin D3 supplementation at 4000 international units per day for one year results in a decrease of positive cores at repeat biopsy in subjects with low-risk prostate cancer under active surveillance. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 7, p. 2315–2324, jul. 2012.

MISRA, P.; REDDY, J. K. Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation and excess energy burning in hepatocarcinogenesis. **Biochimie**, 28 nov. 2013.

NAIR, S. Vitamin d deficiency and liver disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 6, n. 8, p. 491–493, ago. 2010.

MUNETSUNA, E. et al. Anti-proliferative activity of 25-hydroxyvitamin D3 in human prostate cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 2, p. 960–970, 15 fev. 2014.

NEWELL, P. et al. Experimental models of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 858–879, maio 2008.

NONAKA, K. et al. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor inhibits HCC in SCID mice. **The Journal of Surgical Research**, v. 172, n. 1, p. 116–122, jan. 2012.

OZKAN, B.; HATUN, S.; BEREKET, A. Vitamin D intoxication. **The Turkish journal of Pediatrics**, v. 54, n. 2, p. 93–98, abr. 2012.

PITOT, H. C. Adventures in hepatocarcinogenesis. **Annual Review of Pathology**, v. 2, p. 1–29, 2007.

PITOT, H. C. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 859–860, 15 set. 2001.

SAKAI, M.; MURAMATSU, M. Regulation of glutathione transferase P: a tumor marker of hepatocarcinogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 357, n. 3, p. 575–578, 8 jun. 2007.

SATOH, K.; KITAHARA, A.; SATO, K. Identification of heterogeneous and microheterogeneous subunits of glutathione S-transferase in rat liver cytosol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 242, n. 1, p. 104–111, out. 1985.

SCHUSTER, I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1814, n. 1, p. 186–199, jan. 2011.

SCOLASTICI, C. et al. Tomato oleoresin inhibits DNA damage but not diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. **Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 60, n. 1, p. 59–68, jun. 2008.

SOMA, Y.; SATOH, K.; SATO, K. Purification and subunit-structural and immunological characterization of five glutathione S-transferases in human liver, and the acidic form as a

hepatic tumor marker. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 869, n. 3, p. 247–258, 14 fev. 1986.

STEINMETZ, M. O. et al. Rat GTP cyclohydrolase I is a homodecameric protein complex containing high-affinity calcium-binding sites. **Journal of Molecular Biology**, v. 279, n. 1, p. 189–199, 29 maio 1998.

STARKEL, P.; LECLERCQ, I. A. Animal models for the study of hepatic fibrosis. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 319–333, abr. 2011.

SU, Q. ; BANNASCH, P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 1, p. 126–133, fev. 2003.

SU, Q. et al. Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 431, n. 6, p. 391–406, dez. 1997.

TAKAHASHI, M. et al. Cellular distributions of molecules with altered expression specific to the tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 11, p. 2218–2226, nov. 2008.

THUN, M. J. et al. The global burden of cancer: priorities for prevention. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 100–110, jan. 2010.

TSUDA, H. et al. Value of GST-P positive preneoplastic hepatic foci in dose-response studies of hepatocarcinogenesis: evidence for practical thresholds with both genotoxic and nongenotoxic carcinogens. A review of recent work. **Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 1, p. 80–86, fev. 2003.

UMAR, A.; DUNN, B. K.; GREENWALD, P. Future directions in cancer prevention. **Nature Reviews. Cancer**, v. 12, n. 12, p. 835–848, dez. 2012.

VUOLO, L. et al. Vitamin D and cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, p. 58, 2012.

XU, J.; FU, Y.; CHEN, A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to the inhibitory effects of curcumin on rat hepatic stellate cell growth. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 285, n. 1, p. G20–30, jul. 2003.

WACKER, M.; HOLICK, M. F. Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. **Nutrients**, v. 5, n. 1, p. 111–148, jan. 2013.

WANG, Y. et al. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. **International Journal of Cancer. Journal International du cancer**, v. 126, n. 8, p. 1788–1796, 15 abr. 2010.

WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H. F. Where is the vitamin D receptor? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 1, p. 123–133, 1 jul. 2012.

WELSH, J. Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 1, p. 107–114, 1 jul. 2012.

WU, L.; TANG, Z.-Y.; LI, Y. Experimental models of hepatocellular carcinoma: developments and evolution. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 135, n. 8, p. 969–981, ago. 2009.

ZHANG, D. Y.; FRIEDMAN, S. L. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 56, n. 2, p. 769–775, ago. 2012.

ZÚÑIGA, S.; FIRRINCIELI, D.; HOUSSET, C.; CHIGNARD, N. Vitamin D and the vitamin D receptor in liver pathophysiology. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 35, n. 4, p. 295–302, abr. 2011.

